

Rec'd PCT/PTO 12 JUL 2005
PCT/FR2004/000320

10/542056

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 FEV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **12 FEV 2003**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

0301689

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

12 FEV. 2003

Vos références pour ce dossier

(facultatif) **B0187FR**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BECKER & ASSOCIES
35 rue des Mathurins
75008 PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Utilisations d'aminopropanediols acylés et de leurs analogues azotés et sulfurés

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒

Personne morale

☐

Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

GENFIT

Prénoms

Forme juridique

Société Anonyme

N° SIREN

14 2 4 3 4 1 9 0 7

Code APE-NAF

17 3 1 Z

Domicile

ou

siège

Rue

Parc Eurasanté - Lille Métropole

Code postal et ville

885, avenue Eugène Avinée

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

REMISE DES PIÈCES DATE 12 FEV 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0301689 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		TEZIER HERMAN	
Prénom		Béatrice	
Cabinet ou Société		BECKER & ASSOCIES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		00-10000	
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins	
	Code postal et ville	75 008 Paris	
	Pays	France	
N° de téléphone (facultatif)		01 53 43 85 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 53 43 85 05	
Adresse électronique (facultatif)		becker@becker.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques			
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice TEZIER HERMAN CPI 00-10000		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO	

UTILISATIONS D'AMINOPROPANEDIOLS ACYLES ET DE LEURS
ANALOGUES AZOTES ET SULFURES

5 La présente invention concerne l'utilisation de dérivés d'aminopropanediols acylés et leurs analogues azotés et sulfurés, des compositions pharmaceutiques et cosmétiques les comprenant, leurs applications en thérapeutique, notamment pour prévenir ou traiter les maladies cardiovasculaires, le syndrome X, la resténose, le diabète, l'obésité, l'hypertension, certains cancers, des maladies
10 dermatologiques ainsi que dans le domaine cosmétique, pour prévenir ou traiter les effets du vieillissement cutané, notamment l'apparition de rides, etc.

 Les composés de l'invention possèdent notamment des propriétés pharmacologiques anti-oxydantes et anti-inflammatoires avantageuses.
15 L'invention décrit également les procédés de traitement thérapeutique utilisant ces composés et des compositions pharmaceutiques et cosmétiques les contenant.

 L'athérosclérose et ses complications cardiovasculaires sont la principale
20 cause de morbidité et de mortalité dans les pays fortement industrialisés. L'athérosclérose et ses complications sont également une conséquence importante du diabète de type II. Un lien strict de cause à effet a été démontré entre les dyslipidémies et les maladies cardiovasculaires. Un taux circulant élevé de LDL-cholestérol est défavorable. Le risque occasionné par un taux élevé de
25 LDL-cholestérol est amplifié par une élévation du taux de triglycérides. L'importance de la stabilité des lésions athérosclérotiques dans la survenue d'accidents cardiovasculaires a en outre été mise en évidence. Le rôle de l'oxydation des LDL dans le développement de la plaque d'athérosclérose et de sa fragilisation est mieux compris.

30

 Les traitements médicamenteux de l'athérosclérose visent à réduire les taux circulants de cholestérol ou de triglycérides, à augmenter la stabilité des plaques

d'athérosclérose, à réduire les contraintes mécaniques auxquelles sont soumis les vaisseaux (réduction de la tension artérielle) et à réduire les facteurs de risques annexes tels que le diabète.

5 Parmi les médicaments actuellement utilisés dans le traitement des dyslipidémies, on trouve les fibrates et les statines. La metformine, la sulfonylurée, les thiazolidinediones sont utilisées dans le traitement du diabète de type II.

10 Les fibrates sont largement utilisés pour le traitement des hypertriglycéridémies. Ils ont également des effets favorables au niveau de l'hypercholestérolémie. Ils sont généralement bien tolérés mais présentent un certain nombre d'effets secondaires : réactions cutanées, effets neurologiques, effets musculaires et gastro-intestinaux. Les effets toxiques sont rares (reins, 15 muscles, articulation, peau, hépatite, etc.). Quant à l'incidence sur le risque cancéreux, elle est importante chez le rongeur même si elle n'a pas été démontrée chez l'homme.

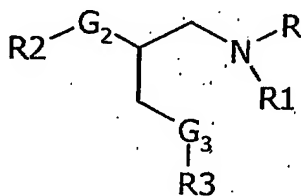
20 Les statines sont largement utilisées pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Il a été démontré que le traitement de patients ayant subi un premier accident vasculaire réduit considérablement le risque de récidence. Des signes occasionnels ou des symptômes d'hépatites ou de myopathie ont par ailleurs été décrits.

25 Les thiazolidinediones (troglitazone) ont récemment été introduites pour le traitement de la résistance à l'insuline. De ce fait, le recul nécessaire à une estimation objective de l'ensemble des effets adverses de ces molécules n'est pas suffisant. Dans ce contexte, l'observation d'une augmentation de la fréquence de tumeurs coliques dans un modèle animal prédisposé au cancer du 30 colon (souris Min portant une mutation du gène APC) est défavorable. Une thiazolidinedione (troglitazone) a d'ailleurs été tout récemment retirée du marché pour des questions de toxicité hépatique.

Les principales molécules utilisées dans le traitement médicamenteux de l'athérosclérose (fibrates, statines) ont un spectre d'action pléiotropique. Les fibrates activent une classe de récepteurs nucléaires (PPAR α , PPAR γ , etc.) impliqués dans la coordination de l'expression de protéines responsables du transport ou du métabolisme des lipides. Le caractère pléiotropique du spectre d'action des fibrates réside dans la diversité des gènes cibles des PPARs. Les statines diminuent la synthèse de novo du cholestérol en inhibant l'activité de l'HMG-CoA réductase.

La présente invention concerne l'utilisation comme médicament d'une famille de composés possédant des propriétés pharmacologiques avantageuses et utilisables pour le traitement curatif ou préventif de diverses pathologies.

Les composés de l'invention répondent à la formule générale (I) :



(I)

dans laquelle :

- G2 et G3 représentent indépendamment un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4, G2 et G3 ne pouvant représenter de façon simultanée un groupe N-R4,
- R et R4 représentent indépendamment un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,

- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un groupe CO-R5 ou un groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6.

5

- R5 est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comprenant éventuellement un groupement cyclique, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone,

10

- X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO₂,

- n est un nombre entier compris entre 0 et 11.

15

- R6 est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comprenant éventuellement un groupe cyclique, dont la chaîne principale comporte de 3 à 23 atomes de carbone, de préférence 10 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe SO₂.

20

25 Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le ou les groupes R5, identiques ou différents, représentent préférentiellement un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale comporte de 1 à 20 atomes de carbone, encore plus préférentiellement de 7 à 17 atomes de carbone, encore plus préférentiellement 14 à 17. Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le ou les

30 groupes R5, identiques ou différents, peuvent aussi représenter un groupe alkyle inférieur comportant de 1 à 6 atomes de carbone, tel que notamment le radical

méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, tertibutyle, pentyle ou hexyle.

Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le ou les groupes R6, identiques ou différents, représentent préférentiellement un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale comporte de 3 à 23 atomes de carbone, préférentiellement de 13 à 20 atomes de carbone, encore plus préférentiellement de 14 à 17 atomes de carbone, et encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone.

Des exemples particuliers de groupes alkyle à chaîne longue saturée pour R5 ou R6 sont notamment les groupes C_7H_{15} , $C_{10}H_{21}$, $C_{11}H_{23}$, $C_{13}H_{27}$, $C_{14}H_{29}$, $C_{15}H_{31}$, $C_{16}H_{33}$, $C_{17}H_{35}$. Des exemples particuliers de groupes alkyle à chaîne longue insaturée pour R5 ou R6 sont notamment les groupes $C_{14}H_{27}$, $C_{14}H_{25}$, $C_{15}H_{29}$, $C_{17}H_{29}$, $C_{17}H_{31}$, $C_{17}H_{33}$, $C_{19}H_{29}$, $C_{19}H_{31}$, $C_{21}H_{31}$, $C_{21}H_{35}$, $C_{21}H_{37}$, $C_{21}H_{39}$, $C_{23}H_{45}$ ou les chaînes alkyle des acides eicosapentaénoïque (EPA) $C_{20:5}(5, 8, 11, 14, 17)$ et docosahexaénoïque (DHA) $C_{22:6}(4, 7, 10, 13, 16, 19)$.

Des exemples de groupes alkyle à chaîne longue ramifiée sont notamment les groupes $(CH_2)_n-CH(CH_3)C_2H_5$, $(CH=C(CH_3)-(CH_2)_2)_n-CH=C(CH_3)_2$ ou $(CH_2)_{2x+1}-C(CH_3)_2-(CH_2)_{n''}-CH_3$ (x étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 11, n' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 22, n'' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 5, n''' étant un nombre entier égal à ou compris entre 0 et 22, et $(2x+n''')$ étant inférieur ou égal à 22).

Comme indiqué ci-avant, les groupes alkyle R5 ou R6 peuvent éventuellement comprendre un groupe cyclique. Des exemples de groupes cycliques sont notamment le cyclopropyle, le cyclobutyle, le cyclopentyle et le cyclohexyle.

Comme indiqué ci-avant, les groupes alkyle R5 ou R6 peuvent être éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants, identiques ou

différents. Les substituants sont choisis de préférence parmi un atome d'halogène (iode, chlore, fluor, brome) et un groupe -OH, =O, -NO₂, -NH₂, -CN, -O-CH₃, -CH₂-OH, -CH₂OCH₃, -CF₃ et -COOZ (Z étant un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle, de préférence comportant de 1 à 5 atomes de carbone).

5

La présente invention a également pour objet l'utilisation des isomères optiques et géométriques de ces composés, leurs racémates, leurs sels, leurs hydrates et leurs mélanges.

10 De préférence, la présente invention concerne l'utilisation de composés de formule (I) dans laquelle les groupes G2R2 et G3R3 ne représentent pas simultanément des groupes hydroxyle.

15 Les composés de formule (Ia) sont les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle un seul des groupes R1, R2 ou R3 représente un atome d'hydrogène.

20 Les composés de formule (Ib) sont les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle deux des groupes R1, R2 ou R3 représentent un atome d'hydrogène.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation de prodrogues des composés de formule (I) ou de compositions les contenant, qui, après administration chez un sujet, vont se transformer en composés de formule (I) qui présentent des activités thérapeutiques comparables aux composés de formule (I).

Par ailleurs, dans le groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, X représente tout préférentiellement un atome de soufre ou de sélénium et avantageusement un atome de soufre.

30

Par ailleurs, dans le groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, n est de préférence compris entre 0 et 3, plus spécifiquement compris entre 0 et 2 et est en particulier égal à 0.

5 Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, R6 peut comporter un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe SO_2 .

10 Un exemple spécifique de groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ selon l'invention est le groupe $\text{CO-CH}_2\text{-S-C}_{14}\text{H}_{29}$.

Des composés préférés au sens de l'invention sont donc des composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle au moins un des groupes R1, R2 et
15 R3 représente un groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ dans lequel X représente un atome de soufre ou de sélénium et de préférence un atome de soufre et/ou R6 est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 3 à 23 atomes de carbone, préférentiellement de 13 à 20 atomes de carbone, de préférence de 14 à 17, plus
20 préférentiellement de 14 à 16, et encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone.

D'autres composés particuliers selon l'invention sont ceux dans lesquels au moins deux des groupes R1, R2 et R3 sont des groupes $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, identiques ou différents, dans lesquels X représente un atome de soufre ou de
25 sélénium et de préférence un atome de soufre.

Des composés particuliers selon l'invention sont ceux dans lesquels G2 représente un atome d'oxygène ou de soufre, et de préférence un atome d'oxygène. Dans ces composés, R2 représente avantageusement un groupe de
30 formule $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ tel que défini ci-avant.

Des composés particulièrement préférés sont les composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle :

- G3 est un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et G2 est un atome d'oxygène ; et/ou
- 5 • R2 représente un groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ tel que défini ci-avant.

D'autres composés préférés sont les composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle R1, R2 et R3, identiques ou différents, de préférence identiques, représentent un groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ tel que défini ci-avant, 10 dans lesquels X représente un atome de soufre ou de sélénium et de préférence un atome de soufre et/ou R6 est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 17, encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone, dans lesquels n est de préférence compris entre 0 et 3, et en particulier égal à 0. De manière plus spécifique, 15 d'autres composés préférés sont les composés de formule générale (I) dans laquelle R1, R2 et R3 représentent des groupes $\text{CO-CH}_2\text{-S-C}_{14}\text{H}_{29}$.

Des exemples de composés préférés selon l'invention sont représentés sur la Figure 1.

20 Ainsi, la présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés de formule (I) choisis parmi :

- 3-(tétradécylthioacétylamino)propane-1,2-diol ;
- 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-(dipalmitoyloxy)propane ;
- 25 - 3-tétradécylthioacétylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 3-palmitoylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-di(tétradécylthioacétylamino)propan-2-ol ;
- 1,3-diamino-2-(tétradécylthioacétyloxy) propane ;
- 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 30 - 1,3-dioléoylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétylthio)propane ; et
- 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane.

L'invention a ainsi pour objet l'utilisation d'au moins un composé tel que décrit ci-dessus pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de diverses pathologies, notamment de pathologies impliquant une dérégulation du métabolisme des lipides et/ou des glucides, des pathologies liées à l'inflammation, et/ou des pathologies liées à la prolifération et/ou à la différenciation cellulaire.

La pathologie liée aux dérèglements du métabolisme lipidique et/ou glucidique et traitée selon l'invention est en particulier choisie parmi le syndrome métabolique (syndrome X), le diabète, l'athérosclérose et l'obésité.

La pathologie liée à l'inflammation traitée selon l'invention est choisie plus particulièrement parmi l'athérosclérose, une allergie, l'asthme, l'eczéma, le psoriasis et les démangeaisons.

La pathologie liée à la prolifération et/ou à la différenciation cellulaire et traitée selon l'invention est en particulier choisie parmi la carcinogenèse, le psoriasis et l'athérosclérose.

La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés de formule (I) tels que définis ci-avant dans la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prophylaxie des maladies cardiovasculaires, du syndrome X, de la resténose, du diabète de type I ou II, de préférence de type II, de l'obésité, de l'hypertension, en particulier l'hypertension artérielle, de cancers, en particulier le cancer de l'anus, du rectum, du colon, de l'intestin, du duodénum, de l'estomac, de la prostate, des testicules, de la vessie, du rein, du pancréas, du foie, du larynx, du sein, des poumons, la leucémie et les mélanomes, et des maladies dermatologiques. Elle a également trait à leur utilisation dans des compositions cosmétiques ou pour la préparation de compositions cosmétiques, pour prévenir ou traiter les effets du vieillissement intrinsèque ou extrinsèque (notamment dû aux rayonnements solaires) cutané,

qui se caractérise notamment par l'apparition de rides, de taches cutanées, etc. Il a en effet été trouvé de manière surprenante que les composés de formule (I) possèdent à la fois des propriétés d'activateurs PPAR, d'antioxydants et d'anti-inflammatoires.

5

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant, dans un support acceptable sur le plan pharmaceutique ou cosmétique, un composé de formule générale (I) tel que décrit ci-dessus, éventuellement en association avec un autre actif thérapeutique, destinée à traiter de manière préventive ou curative les pathologies et les désordres mentionnés ci-dessus.

10

L'invention a également pour objet une méthode de traitement des pathologies ou des désordres cités ci-avant, comprenant l'administration à un sujet, notamment animal ou en particulier humain, d'une dose efficace d'un composé de formule (I) ou d'une composition pharmaceutique tels que définis ci-avant. Par traitement, on entend aussi bien le traitement curatif que préventif.

15

Avantageusement, les composés de formule (I) utilisés sont tels que définis ci-dessus.

20

Les compositions pharmaceutiques ou cosmétiques selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules, acceptables sur le plan pharmaceutique ou cosmétique. On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique ou cosmétique et connues de l'homme du métier. Les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, surfactants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc. Les

25

30

compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise
5 avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être par exemple administrés de manière systémique, par voie orale, parentérale, par
10 inhalation ou par injection, comme par exemple par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. A cet égard, les composés sont généralement dissous
15 dans des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Ainsi, les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, émulsifiants, stabilisants, surfactants, conservateurs, tampons, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des
20 formulations liquides et/ou injectables sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, les liposomes, etc.

25 Les composés peuvent ainsi être administrés sous forme de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, aérosols, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise
30 avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les composés peuvent être administrés oralement auquel cas les agents ou véhicules utilisés sont choisis préférentiellement parmi l'eau, la gélatine, les

gommes, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le talc, une huile, le polyalkylène glycol, etc.

5 Pour une administration parentérale, les composés sont préférentiellement administrés sous la forme de solutions, suspensions ou émulsions avec notamment de l'eau, de l'huile ou des polyalkylène glycols auxquels il est possible d'ajouter, outre des agents conservateurs, stabilisants, émulsifiants, etc., des sels permettant d'ajuster la pression osmotique, des tampons, etc.

10 Pour un usage cosmétique, les composés de l'invention peuvent être administrés sous toute forme habituelle en cosmétique, notamment crème, comme par exemple des crèmes de soin, des crèmes solaires, des huiles, des gels, des lotions, etc..

15 Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie concernée, du mode d'administration, etc. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 1 μ g et 2 g par administration, préférentiellement de 0,1 mg à 1 g par administration. Les administrations peuvent être quotidiennes ou
20 répétées plusieurs fois par jour, le cas échéant. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre, en outre, d'autres agents ou principes actifs.

25 Les composés de l'invention peuvent être préparés à partir de produits du commerce, en mettant en œuvre une combinaison de réactions chimiques connues de l'homme du métier. L'invention a également pour objet des procédés de préparation des composés tels que définis ci-avant.

30 Selon un procédé de l'invention, les composés de formule (I) dans lesquels (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, de soufre ou un groupe N-R4, (ii) R et, le cas échéant R4, représentent de façon identique, un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de

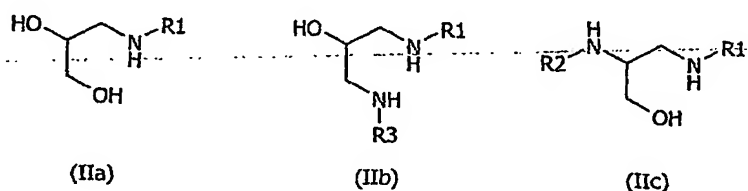
carbones et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, sont obtenus à partir d'un composé de formule (I) dans laquelle (i) G2 ou G3 sont des atomes d'oxygène, de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, et d'un composé de formule A1-LG dans laquelle A1 représente le groupe R ou, le cas échéant, R4 et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi Cl, Br, mésyl, tosyl, etc., en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Selon un premier mode, les composés de formule (I) dans lesquels (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques, représentent un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, sont obtenus à partir d'un composé de formule (I) dans laquelle (i) G2 ou G3 sont des atomes d'oxygène, de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène et d'un composé de formule A°-CO-A dans laquelle A est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH, Cl, O-CO-A° et O-R7, R7 étant un groupe alkyle, et A° est le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 peuvent être obtenus selon différentes méthodes qui permettent la synthèse de composés dans lesquels les groupes portés par un même hétéroatome (azote ou oxygène) ont même signification.

Selon un premier mode, on fait réagir une molécule de 1-aminoglycérol, de 1,3-diaminoglycérol ou de 1,2-diaminoglycérol (obtenu en adaptant le protocole décrit par (Morris, Atassi et al. 1997) avec un composé de formule A°-CO-A1

dans laquelle A1 est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH, Cl et OR7, R7 étant un groupe alkyle, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6 en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier. Cette réaction permet l'obtention respective de formes particulières de composés de formule (I), nommées composés (IIa-c), et peut être mise en œuvre en adaptant des protocoles décrits par (Urakami and Kakeda 1953; Shealy, Frye et al. 1984; Marx, Piantadosi et al. 1988; Rahman, Ziering et al. 1988) et (Nazih, Cordier et al. 1999). Dans les composés (IIb-c), les groupements portés par un même hétéroatome, respectivement, (R1 et R3) et (R1 et R2) ont même signification.



Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus à partir d'un composé de formule (IIa-c) et d'un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier. Cette réaction permet la synthèse de composés dans lesquels les groupements portés par un même hétéroatome (azote ou oxygène), respectivement (R1 et R2), ou (R1 et R3), ou (R2 et R3) ont même signification. Cette réaction est avantageusement réalisée selon le protocole décrit par exemple dans (Urakami and Kakeda 1953; Nazih, Cordier et al. 1999).

Selon un autre procédé particulier de l'invention (schéma 1), les composés de formule (I) dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène ou un groupe

NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus selon les étapes suivantes :

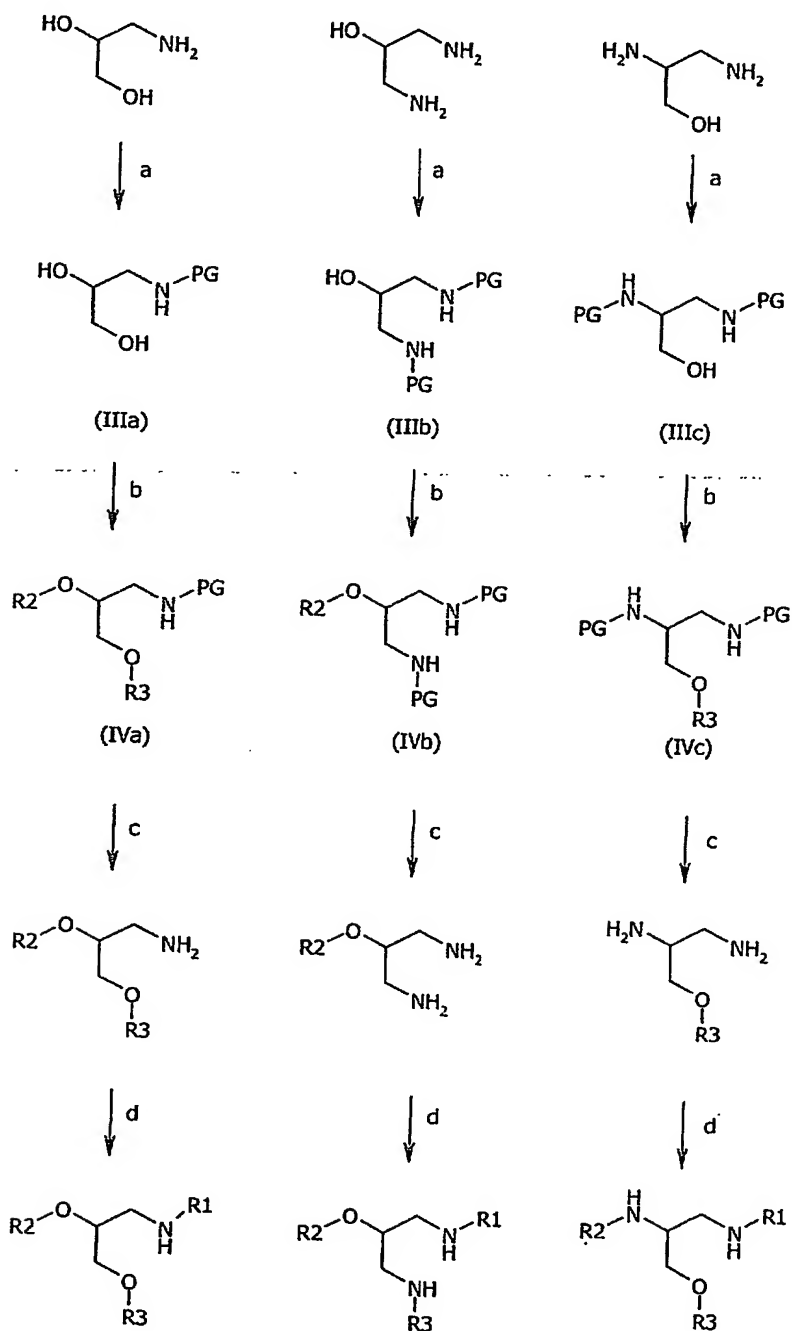
5 a) réaction du 1-aminoglycérol, du 1,3-diaminoglycérol ou du 1,2-diaminoglycérol avec un composé (PG)₂O dans lequel PG est un groupement protecteur pour donner un composé de formule générale (IIIa-c). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Nazih, Cordier et al. 2000; 10 Kotsovolou, Chiou et al. 2001) dans lesquels (PG)₂O représente le dicarbonate de di-tert-butyle ;

b) réaction du composé de formule (IIIa-c) avec un composé de 15 formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (IVa-c), dans laquelle R2 et R3 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 et PG est un groupement protecteur ;

20 c) déprotection du composé (IVa-c), selon des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 représente un atome d'oxygène ou un groupe NH, (ii) R et R1 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R2 et 25 R3 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;

d) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 représentent un atome d'oxygène ou un groupe NH, (ii) R et R1 30 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R2 et R3 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence

éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. protection ; b. acylation ; c. déprotection ; d. amidification

schéma 1

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus de différentes façons.

Selon une première méthode, on fait réagir un composé de formule (I) selon l'invention, dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R et R2 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R1, R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Selon ce mode de préparation, les composés de formule (I) dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R et R2 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus à partir d'un composé de formule (IIa) tel que défini ci-avant avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Selon un autre procédé particulier de l'invention, les composés de formule (I) dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus à partir d'un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R, R2 et R3 représentent un atome d'hydrogène et (iii) R1

est un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 (composé de formule (IIa)) selon les étapes suivantes (schéma 2):

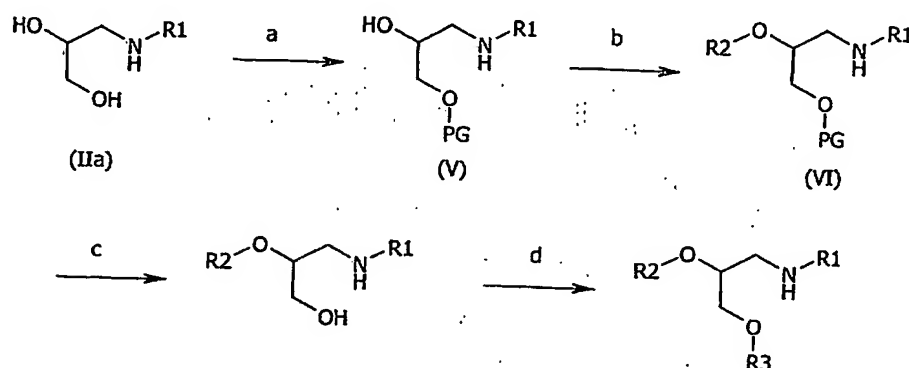
a) réaction du composé de formule (IIa) avec un composé PG-E dans lequel PG est un groupement protecteur et E est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (V) dans laquelle R1 est un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6. La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 1988; Gaffney and Reese 1997) dans lesquels PG-E peut représenter le chlorure de triphénylméthyle ou le 9-phénylxanthène-9-ol ou encore le 9-chloro-9-phénylxanthène ;

b) réaction du composé de formule (V) avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (VI), dans laquelle R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 et PG est un groupement protecteur ;

c) déprotection du composé (VI), dans des conditions connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R et R3 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;

d) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes d'oxygène, (ii) R et R3 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre

OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a : protection ; b : estérification ; c : déprotection ; d : estérification

schéma 2

Les étapes ci-dessus peuvent être réalisées avantageusement selon les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 1988).

Selon un autre procédé de l'invention, les composés de formule (I) dans lesquels (i) G2 ou G3 représentent un atome d'oxygène ou un groupe N-R4, (ii) au moins un des groupes G2 ou G3 représente un groupe N-R4, (iii) R et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et (iv) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, sont obtenus par réaction d'un composé de formule (I) dans laquelle (i) l'un des groupes G2R2 ou G3R3 représente un groupe hydroxyle et l'autre groupe G2R2 ou G3R3 représente respectivement un groupe NR4R2 ou NR4R3 avec R2 ou R3 représentant un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, (ii) R et R4 représentent indépendamment un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et (iii) R1 représente un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un

groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

5 Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) l'un des groupes G2R2 ou G3R3 représente un groupe hydroxyle et l'autre groupe G2R2 ou G3R3 représente respectivement un groupe NR4R2 ou NR4R3 avec R2 ou R3 représentant un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, (ii) R et R4
10 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et (iii) R1 représente un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$ sont obtenus à partir d'un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle l'un
des groupes G2R2 ou G3R3 représente un groupe hydroxyle et l'autre groupe G2R2 ou G3R3 représente respectivement un groupe NR4R2 ou NR4R3 avec
15 R2 ou R3 représentant un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, (ii) R et R4 représentent indépendamment un groupe tel que défini ci-avant et (iii) R1 est un atome d'hydrogène avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, en présence éventuellement d'agents de
20 couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Dans un premier mode, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 est un atome d'oxygène, (ii) G3 représente un groupe N-R4, (iii) R
25 et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (iv) R1 et R2 sont des atomes d'hydrogène et (v) R3 représente un groupe CO-R5 ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$ sont obtenus de la façon suivante (schéma 3) :

30

a) réaction du 1-aminoglycérol avec un composé de formule R-CHO dans laquelle R représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou

non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et CHO est la fonction aldéhyde en présence d'agents réducteurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule (VII) dans laquelle R est un groupe tel que défini plus avant. Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Antoniadou-Vyzas, Foscolos et al. 1986) ;

b) réaction d'un composé de formule (VII) avec un composé $(PG)_2O$ dans lequel PG est un groupement protecteur pour donner un composé de formule générale (VIII). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Nazih, Cordier et al. 2000; Kotsovolou, Chiou et al. 2001) dans lesquels $(PG)_2O$ représente le dicarbonate de di-tert-butyle ;

c) réaction d'un composé de formule (VIII) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (IX) en adaptant la procédure décrite par (Kitchin, Bethell et al. 1994) ;

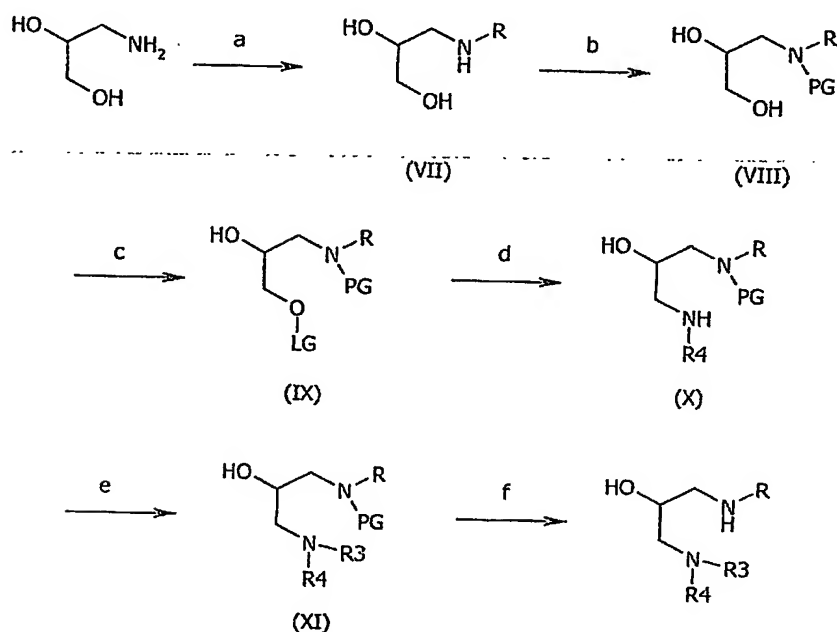
d) réaction d'un composé de formule (IX) avec un composé de formule R_4-NH_2 dans laquelle R_4 représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et NH_2 représente la fonction amine, selon la méthode décrite par (Ramalingan, Raju et al. 1995), pour obtenir un composé de formule (X) dans laquelle R et R_4 , éventuellement différents, sont tels que définis ci-avant ;

e) réaction d'un composé de formule (X) avec un composé de formule $A^\circ-CO-A_2$ dans laquelle A_2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R_5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R_6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs

connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule (XI) dans laquelle R et R4 représentent des groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, R3 représente le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$ et PG est un groupement protecteur ;

5

f) déprotection du composé (XI) selon des conditions connues de l'homme de métier.



a. amination réductrice ; b. protection ; c. activation ; d. substitution ;
e. amidification ; f. déprotection

Schéma3

Selon un second mode, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G3 est un atome d'oxygène, (ii) G2 représente un groupe $N-R4$, (iii) R et R4 représentent des groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (iv) R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène et (v) R2 représente un groupe $CO-R5$ ou un groupe $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R6$ sont obtenus de la façon suivante (schéma 4) :

15

5 a) réaction d'un composé de formule (VIII) avec un composé PG'-E dans lequel PG' est un groupement protecteur et E est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (XII) dans laquelle R représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et PG un autre groupement protecteur tel que défini plus avant. La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 10 1988; Gaffney and Reese 1997) dans lesquels PG'-E peut représenter le chlorure de triphénylméthyle ou le 9-phénylxanthène-9-ol ou encore le 9-chloro-9-phénylxanthène ;

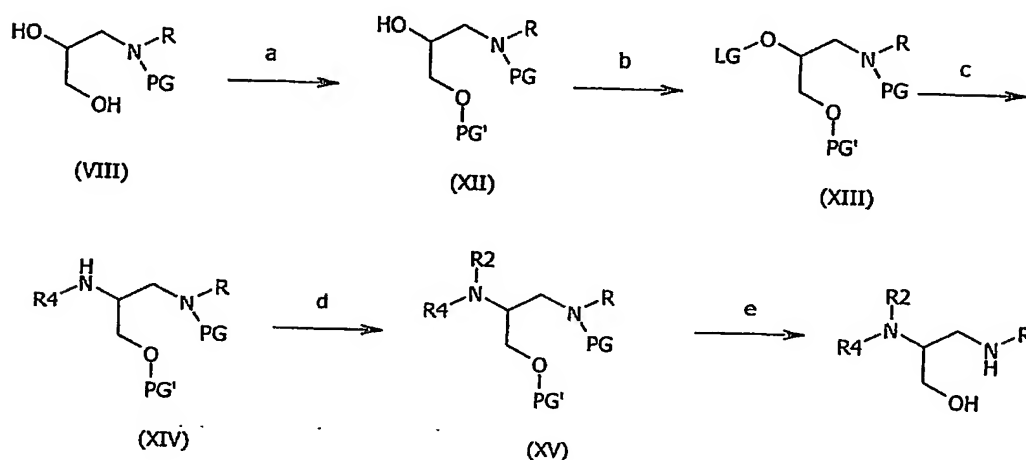
15 b) réaction d'un composé de formule (XII) tel que défini ci-avant avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XIII) dans laquelle R représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et PG et PG' sont des groupements protecteurs, en adaptant la procédure décrite par (Kitchin, 20 Bethell et al. 1994) ;

25 c) réaction d'un composé de formule (XIII) tel que défini ci-avant avec un composé de formule R4-NH₂ dans laquelle R4 représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et NH₂ représente la fonction amine, selon la méthode décrite par (Ramalingan, Raju et al. 1995), pour obtenir un composé de formule (XIV) dans laquelle R et R4 sont indépendamment tels que définis ci-avant ;

30 d) réaction d'un composé de formule (XIV) avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre

OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule (XV) dans laquelle R et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, R2 représente un groupe CO-R5 ou un groupe CO- $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, PG et PG' sont des groupements protecteurs ;

e) déprotection d'un composé de formule (XV) dans des conditions classiques connues de l'homme du métier pour obtenir un composé de formule générale (I) selon l'invention dans laquelle (i) R et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (ii) R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R2 représente un groupe CO-R5 ou un groupe CO- $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$.



a. protection ; b. activation ; c. substitution ; d. amidification ; e. déprotection

Schéma 4

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii)

R1, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 peuvent être obtenus selon différents procédés.

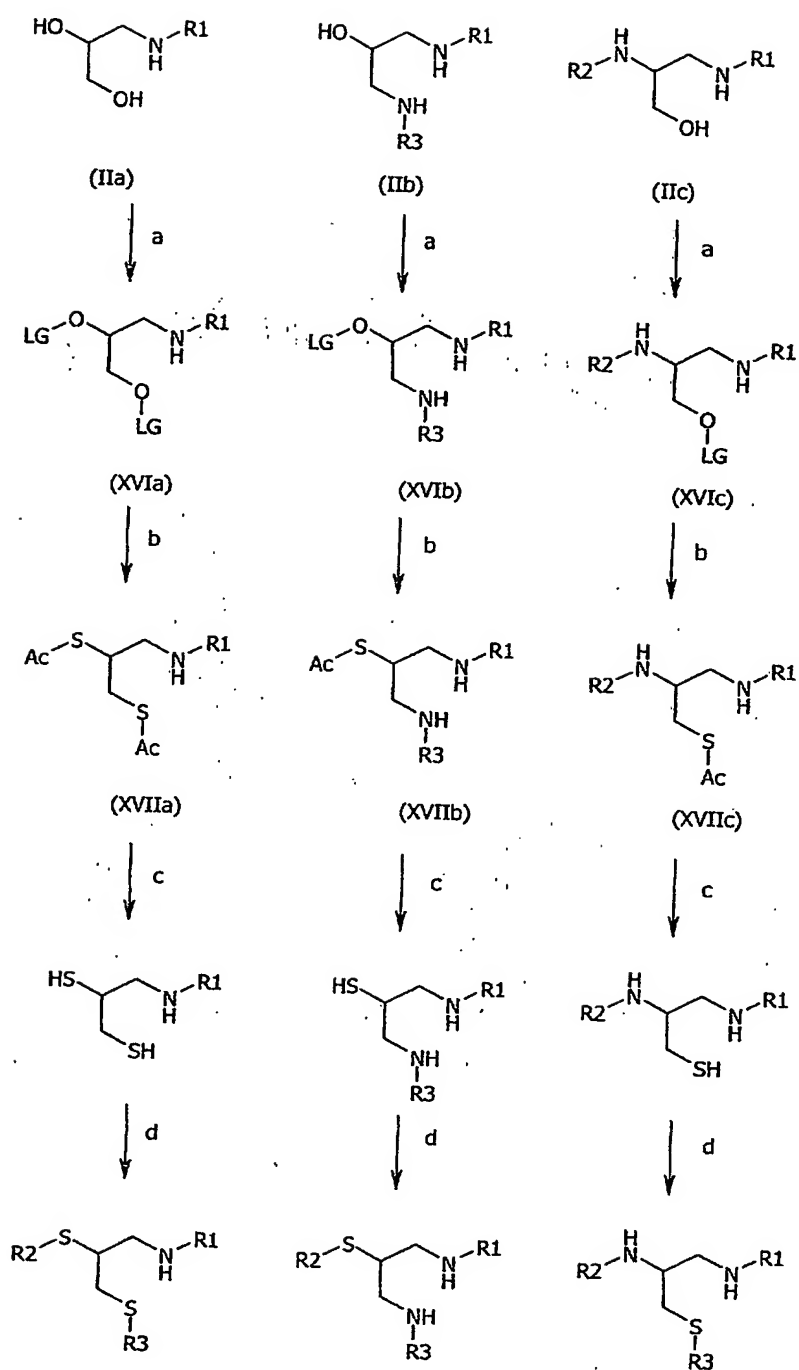
5 Selon un premier mode, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou
10 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, R1, R2 et R3 ayant même signification s'ils sont portés par un même hétéroatome (soufre ou azote), peuvent être obtenus de la façon suivante (schéma 5) :

a) réaction d'un composé de formule (IIa-c) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif
15 choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XVIa-c) ;

b) réaction d'un composé de formule (XVIa-c) avec un composé de formule Ac-S⁻B⁺ dans laquelle Ac. représente un groupe acyle, court,
20 préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XVIIa-c). Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

25 c) déprotection d'un composé de formule (XVIIa-c), dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, et par exemple en milieu basique, pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 représentent un atome de soufre ou un groupe NH et (ii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un
30 groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;

- 5 d) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 et G3 représentent un atome de soufre ou un groupe NH et (ii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. activation ; b. substitution ; c. déprotection ; d. acylation

schéma 5

Ce schéma réactionnel permet la synthèse de composés de formule générale
 5 (I) dans laquelle les groupements portés par un même hétéroatome (azote ou

soufre) respectivement (R2 et R3), (R1 et R3) et (R1 et R2) ont même signification.

Les étapes ci-dessus peuvent être réalisées avantageusement selon les protocoles décrits par (Adams, Doyle et al. 1960; Gronowitz, Herslöf et al. 1978).

5

Selon un autre procédé de l'invention, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes de soufre ou un groupe NH, (ii) R est un atome d'hydrogène et (iii) R1, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 peuvent être préparés à partir des composés de formule (IIla-c) par un procédé comprenant (schéma 6) :

a) la réaction d'un composé de formule (IIla-c) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XVIIIa-c) dans laquelle PG représente un groupement protecteur ;

b) la réaction d'un composé de formule (XVIIIa-c) avec un composé de formule Ac-S⁻B⁺ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XIXa-c). Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

c) la déprotection de l'atome de soufre d'un composé (XIXa-c) dans des conditions connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (XXa-c) ;

30

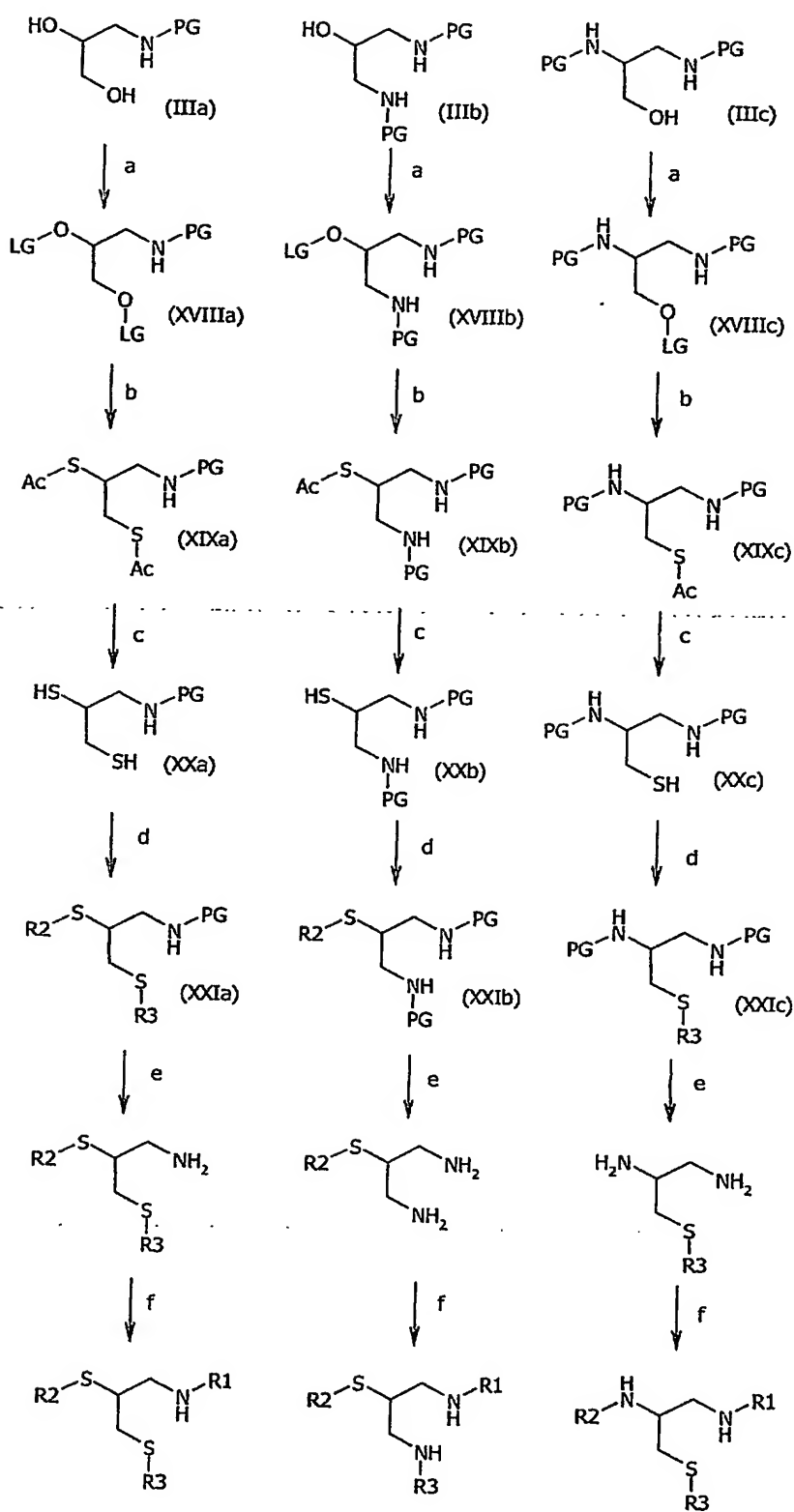
d) la réaction d'un composé de formule générale (XXa-c) avec un composé de formule A° -CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}$ -X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XXIa-c) dans laquelle R2 et R3 représentent un groupe CO-R5 ou $CO-(CH_2)_{2n+1}$ -X-R6 ;

e) la déprotection d'un composé de formule (XXIa-c) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour obtenir un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes de soufre ou un groupe NH, (ii) R et R1 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R2 et R3 représentent un atome d'hydrogène, un groupe CO-R5 ou $CO-(CH_2)_{2n+1}$ -X-R6.

f) la réaction d'un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 et G3 sont des atomes de soufre ou un groupe NH, (ii) R et R1 sont des atomes d'hydrogène et (iii) R2 et R3 représentent un atome d'hydrogène, un groupe CO-R5 ou $CO-(CH_2)_{2n+1}$ -X-R6 avec un composé de formule A° -CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}$ -X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Ce schéma réactionnel permet la synthèse de composés de formule générale (I) dans laquelle les groupements portés par un même hétéroatome (azote ou soufre) respectivement (R2 et R3), (R1 et R3) et (R1 et R2) ont même signification.

Les étapes ci-dessus peuvent être réalisées avantageusement selon les protocoles décrits par (Adams, Doyle et al. 1960; Gronowitz, Herslöf et al. 1978; Bhatia and Hajdu 1987; Murata, Ikoma et al. 1991).



a. activation ; b. substitution ; c. déprotection ; d. acylation ; e. déprotection ; f. amidification

schéma 6

Les composés de formule générale (I) dans lesquels (i) G2 et G3 représentent des atomes de soufre ou un groupe N-R4, (ii) R et R4 représentent indépendamment un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (iii) R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, sont obtenus par réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) les groupes G2 ou G3 représentent un atome de soufre ou un groupe N-R4, (ii) R et R4 représentent indépendamment des groupes tels que définis ci-avant, (iii) R1 est un atome d'hydrogène et (iv) R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

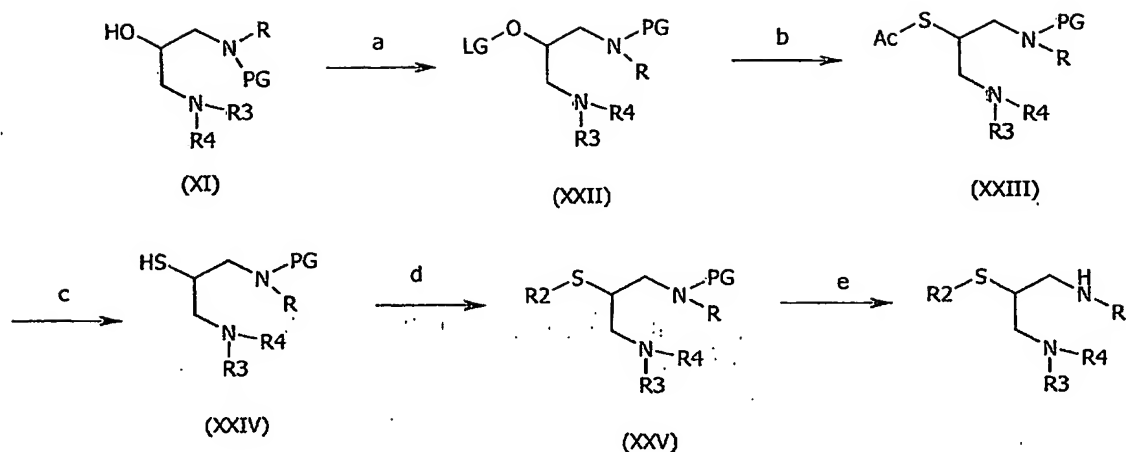
Les composés de formule générale (I) dans laquelle (i) les groupes G2 et G3 représentent un atome de soufre ou un groupe N-R4, (ii) R et R4 représentent indépendamment des groupes tels que définis ci-avant, (iii) R1 est un atome d'hydrogène et (iv) R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être obtenus selon les méthodes suivantes :

25

Dans un premier mode, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) le groupe G2 est un atome de soufre, (ii) G3 représente un groupe N-R4, (iii) R et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (iv) R1 est un atome d'hydrogène et (v) R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 sont obtenus de la façon suivante (schéma 7) :

30

- 5 a) réaction d'un composé de formule (XI) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XXII) dans laquelle PG représente un groupement protecteur ;
- 10 b) réaction d'un composé de formule (XXII) avec un composé de formule Ac-S⁻B⁺ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XXIII). Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;
- 15 c) déprotection de l'atome de soufre d'un composé de formule (XXIII) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (XXIV) ;
- 20 d) réaction d'un composé de formule générale (XXIV) avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XXV) dans laquelle R2 et R3, identiques ou différents,
- 25 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;
- e) déprotection du composé de formule (XXV) dans des conditions connues de l'homme de métier.



a. activation ; b. substitution ; c. déprotection ; d. acylation ; e. déprotection

schéma 7

5 Selon une autre méthode, les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 représente un groupe N-R4, (ii) G3 est un atome de soufre, (iii) R et R4 représentent indépendamment des groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbones, (iv) R1 est un atome d'hydrogène et (v) R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou
10 un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 sont obtenus de la façon suivante (schéma 8) :

a) réaction du composé de formule (IX) avec un composé de formule Ac-S⁻ B⁺ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XXVI). Cette réaction peut
15 avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

20

b) réaction d'un composé de formule (XXVI) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosylo, etc., pour donner un composé de

formule générale (XXVII) dans laquelle PG représente un groupement protecteur ;

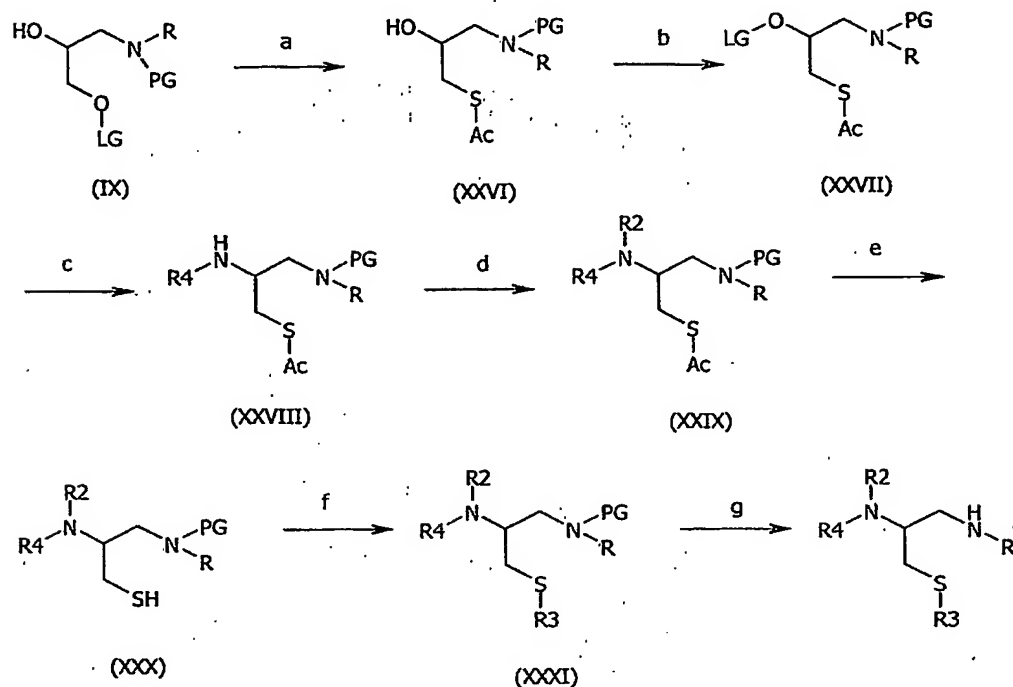
5 c) réaction du composé (XXVII) avec un composé de formule R_4-NH_2 dans laquelle R_4 représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbones et NH_2 représente la fonction amine, selon la méthode décrite par (Ramalingan, Raju et al. 1995), pour obtenir un composé de formule (XXVIII) dans laquelle R et R_4 , représentent indépendamment des
10 groupes alkyle linéaires ou ramifiés différents, saturés ou non, éventuellement substitués, comportant de 1 à 5 atomes de carbone ;

d) réaction d'un composé de formule générale (XXVIII) avec un composé de
15 formule $A^\circ-CO-A_2$ dans laquelle A_2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R_5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R_6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XXIX) ;

20 e) déprotection de l'atome de soufre d'un composé de formule (XXIX) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (XXX) ;

25 f) réaction d'un composé de formule générale (XXX) avec un composé de formule $A^\circ-CO-A_2$ dans laquelle A_2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R_5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R_6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule
30 générale (XXXI) dans laquelle R_2 et R_3 , identiques ou différents, représentent un groupe $CO-R_5$ ou $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R_6$;

g) déprotection d'un composé de formule (XXXI) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier.



a. substitution ; b. activation ; c. substitution ; d. amidification ; e. déprotection ; f. acylation ; g. déprotection

schéma 8

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 est un atome de soufre, (ii) G3 est un atome d'oxygène, (iii) R est un atome d'hydrogène, (iv) R1 et R2 représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 et (v) R3 est un atome d'hydrogène ou représente un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être préparés à partir des composés de formule (V) par le procédé suivant (schéma 9):

a) réaction du composé (V) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XXXII) dans laquelle PG représente un groupement protecteur ;

b) réaction d'un composé de formule (XXXII) avec un composé de formule $\text{Ac-S}^-\text{B}^+$ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XXXIII). Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

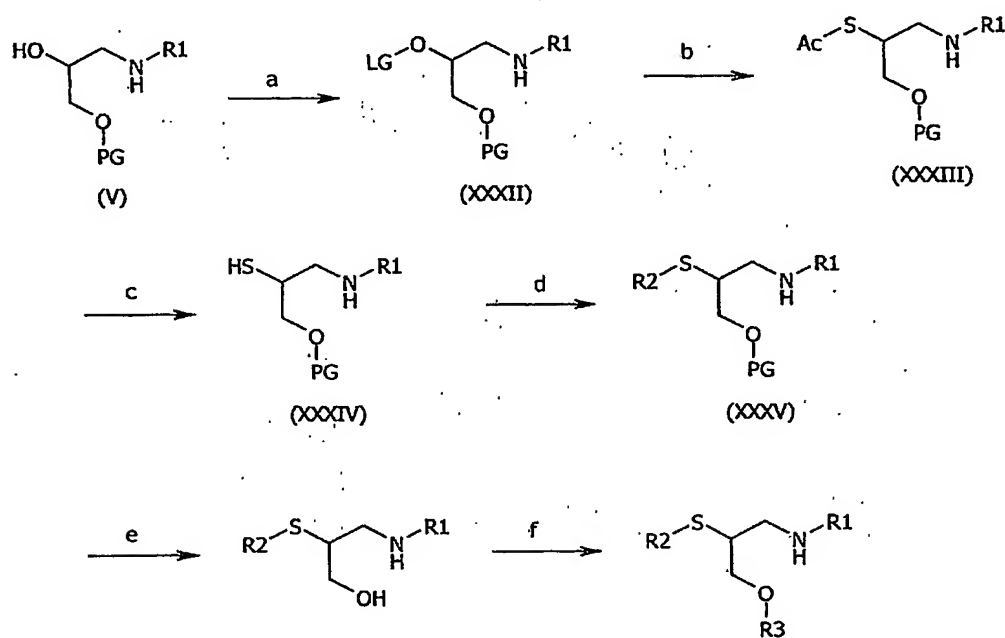
c) déprotection de l'atome de soufre d'un composé (XXXIII), dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (XXXIV) ;

d) réaction d'un composé de formule générale (XXXIV) avec un composé de formule $\text{A}^\circ\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XXXV) dans laquelle R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou $\text{CO-(CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$;

e) déprotection d'un composé (XXXV) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome de soufre, G3 est un atome d'oxygène, R et R3 sont des atomes d'hydrogène et R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou $\text{CO-(CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$;

f) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle (i) G2 est un atome de soufre, (ii) G3 est un atome d'oxygène, (iii) R et R3 sont des atomes d'hydrogène et (iv) R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou $\text{CO-(CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ avec un composé de formule $\text{A}^\circ\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par

exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. activation ; b. substitution ; c. déprotection ; d. acylation ; e. déprotection ; f. acylation

schéma 9

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 est un atome de soufre, (ii) G3 est un atome d'oxygène, (iii) R est un atome d'hydrogène, (iv) R1 et R3 représentent un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R5 ou CO- $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, identiques ou différents, et (v) R2 représente un groupe CO-R5 ou CO- $(CH_2)_{2n+1}-X-R6$, peuvent être préparés à partir des composés de formule (IIIa) par le procédé suivant (schéma 10):

- 15 a) réaction d'un composé de formule (IIIa) avec un composé PG'-E dans lequel PG' est un groupement protecteur et E est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (XXXVI) dans laquelle PG est un autre groupe protecteur tel que défini plus avant. La réaction peut avantageusement

être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 1988) et (Gaffney and Reese 1997) dans lesquels PG-E peut représenter le chlorure de triphénylméthyle ou le 9-phénylxanthène-9-ol ou encore le 9-chloro-9-phénylxanthène ;

5

b) réaction du composé (XXXVI) avec un composé de formule LG-E dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XXXVII) dans laquelle PG et PG' représentent des groupements protecteurs judicieusement choisis tels que définis plus avant ;

10

c) réaction d'un composé de formule (XXXVII) avec un composé de formule $\text{Ac-S}^-\text{B}^+$ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XXXVIII). Cette réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

15

d) déprotection de l'atome de soufre d'un composé (XXXVIII), dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (XXXIX) ;

20

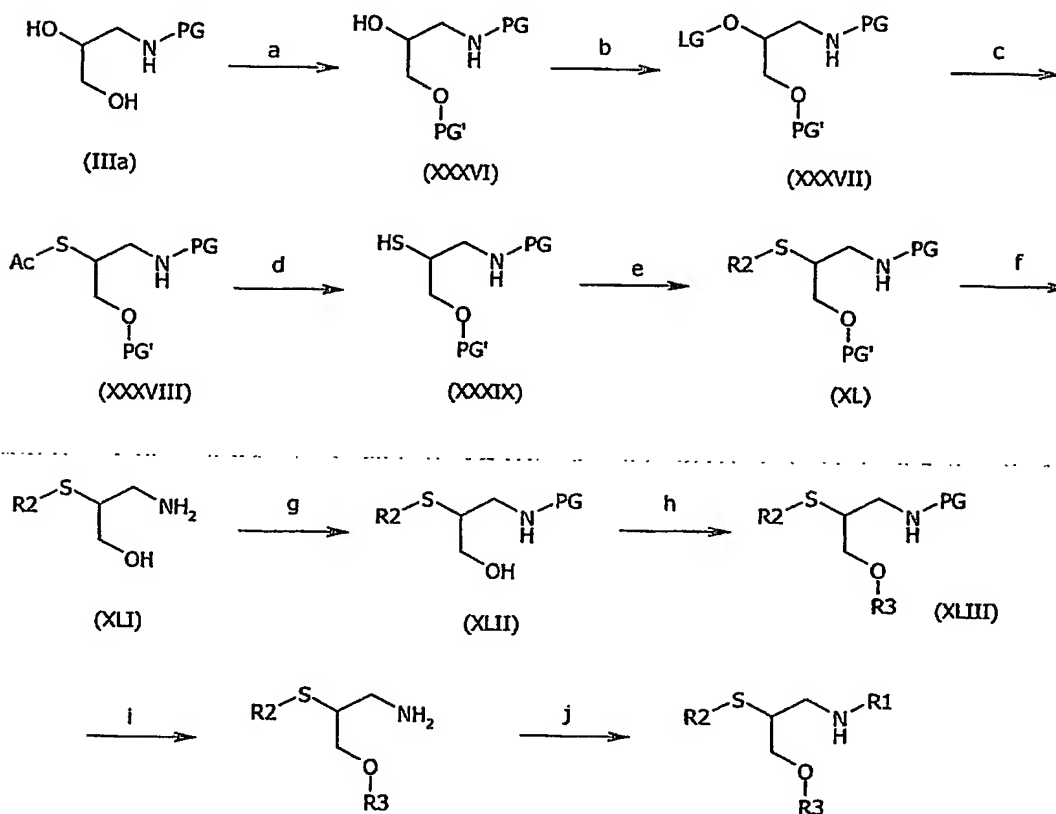
e) réaction d'un composé de formule générale (XXXIX) avec un composé de formule $\text{A}^\circ\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XL) dans laquelle R2 représente un groupe CO-R5 ou $\text{CO-}(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$;

25

30

- 5 f) déprotection d'un composé (XL) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome de soufre, G3 est un atome d'oxygène, R, R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène et R2 représente un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 (composé XLI) ;
- 10 g) réaction d'un composé de formule (XLI) avec un composé (PG)₂O dans lequel PG est un groupement protecteur pour donner un composé de formule générale (XLII). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Nazih, Cordier et al. 2000) et (Kotsovolou, Chiou et al. 2001) dans lesquels (PG)₂O représente le dicarbonate de di-tert-butyle ;
- 15 h) réaction d'un composé de formule générale (XLII) avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule (XLIII) ;
- 20 i) déprotection d'un composé (XLIII) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome de soufre, G3 est un atome d'oxygène, R et R1 sont des atomes d'hydrogène et R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;
- 25 j) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome de soufre, G3 est un atome d'oxygène, R et R1 sont des atomes d'hydrogène et R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence
- 30

éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. protection ; b. activation ; c. substitution ; d. déprotection ; e. acylation ; f. déprotection ; g : protection ; h : acylation ; i : déprotection ; j : amidification

5

schéma 10

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 est un atome d'oxygène, (ii) G3 est un atome de soufre, (iii) R est un atome d'hydrogène, (iv) R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 et (v) R2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être préparés à partir des composés de formule (IIa) selon le procédé suivant (schéma 11) :

15

a) réaction d'un composé de formule (IIa) tel que défini ci-avant, avec un composé de formule LG-E (en quantité stoechiométrique) dans

laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XLIV) ;

5 b) réaction d'un composé de formule (XLIV) avec un composé de formule $\text{Ac-S}^-\text{B}^+$ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium pour donner le composé de formule générale (XLV). Cette réaction peut
10 avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

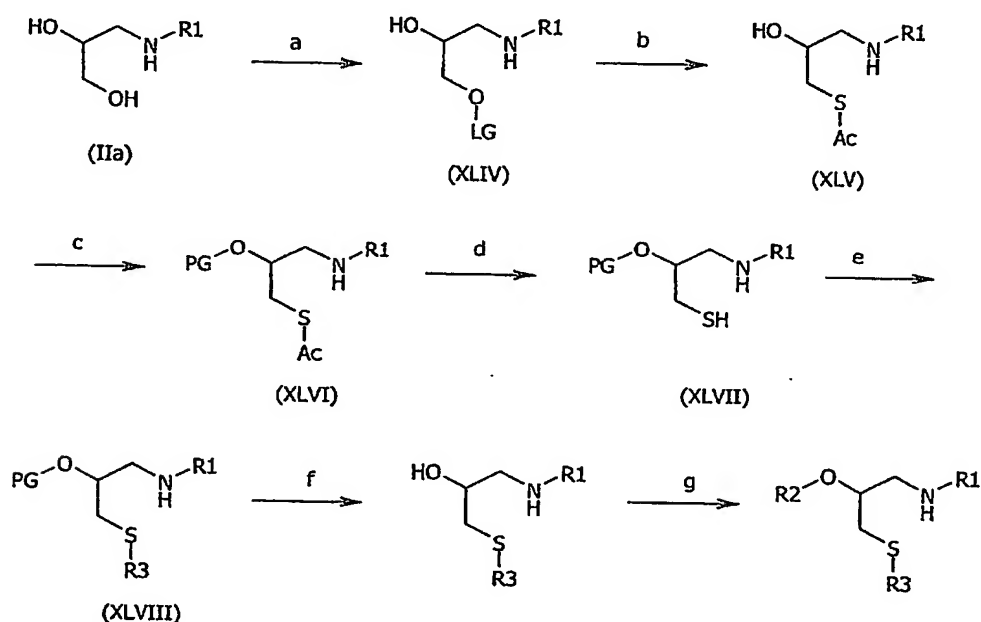
 c) réaction d'un composé de formule (XLV) avec un composé PG-E dans lequel PG est un groupement protecteur et E est un groupe réactif
15 choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (XLVI). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 1988) et (Gaffney and Reese 1997), dans lesquels PG-E peut représenter le chlorure de triphénylméthyle ou le 9-phénylxanthène-9-ol ou encore le
20 9-chloro-9-phénylxanthène ;

 d) déprotection de l'atome de soufre d'un composé (XLVI), dans des conditions connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (XLVII) ;

25 e) réaction d'un composé de formule générale (XLVII) avec un composé de formule $\text{A}^\circ\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou
30 d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule générale (XLVIII) dans laquelle R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou $\text{CO-(CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$;

f) déprotection d'un composé de formule (XLVIII), dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome d'oxygène, G3 est un atome de soufre, R et R2 sont des atomes d'hydrogène et R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;

g) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle G2 est un atome d'oxygène, G3 est un atome de soufre, R et R2 sont des atomes d'hydrogène et R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. activation ; b. substitution ; c. protection ; d. déprotection sélective ; e. acylation ;
f. déprotection ; g. acylation

schéma 11

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle (i) G2 est un atome d'oxygène, (ii) G3 est un atome de soufre, (iii) R est un atome d'hydrogène, (iv) R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène ou représentent un groupe CO-R5 ou
 5 CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, identiques ou différents, et (v) R3 représente un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, peuvent être préparés à partir des composés de formule (IIIa) selon le procédé suivant (schéma 12) :

10 a) réaction d'un composé de formule (IIIa) tel que défini ci-avant, avec un composé de formule LG-E (en quantité stoechiométrique) dans laquelle E représente un halogène et LG un groupe réactif choisi par exemple parmi mésyle, tosyle, etc., pour donner un composé de formule générale (XLIX) ;

15 b) réaction d'un composé de formule (XLIX) avec un composé de formule Ac-S⁻B⁺ dans laquelle Ac représente un groupe acyle court, préférentiellement le groupe acétyle, et B est un contre-ion choisi par exemple parmi le sodium ou le potassium, préférentiellement le potassium, pour donner le composé de formule générale (L). Cette réaction peut
 20 avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par (Gronowitz, Herslöf et al. 1978) ;

25 c) réaction d'un composé de formule (L) avec un composé PG'-E dans lequel PG' est un groupement protecteur et E est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (LI). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Marx, Piantadosi et al. 1988) et (Gaffney and Reese 1997) dans lesquels PG'-E peut représenter
 30 le chlorure de triphénylméthyle ou le 9-phénylxanthène-9-ol ou encore le 9-chloro-9-phénylxanthène ;

d) déprotection de l'atome de soufre d'un composé (LI), dans des conditions connues de l'homme de métier, pour donner un composé de formule générale (LII) ;

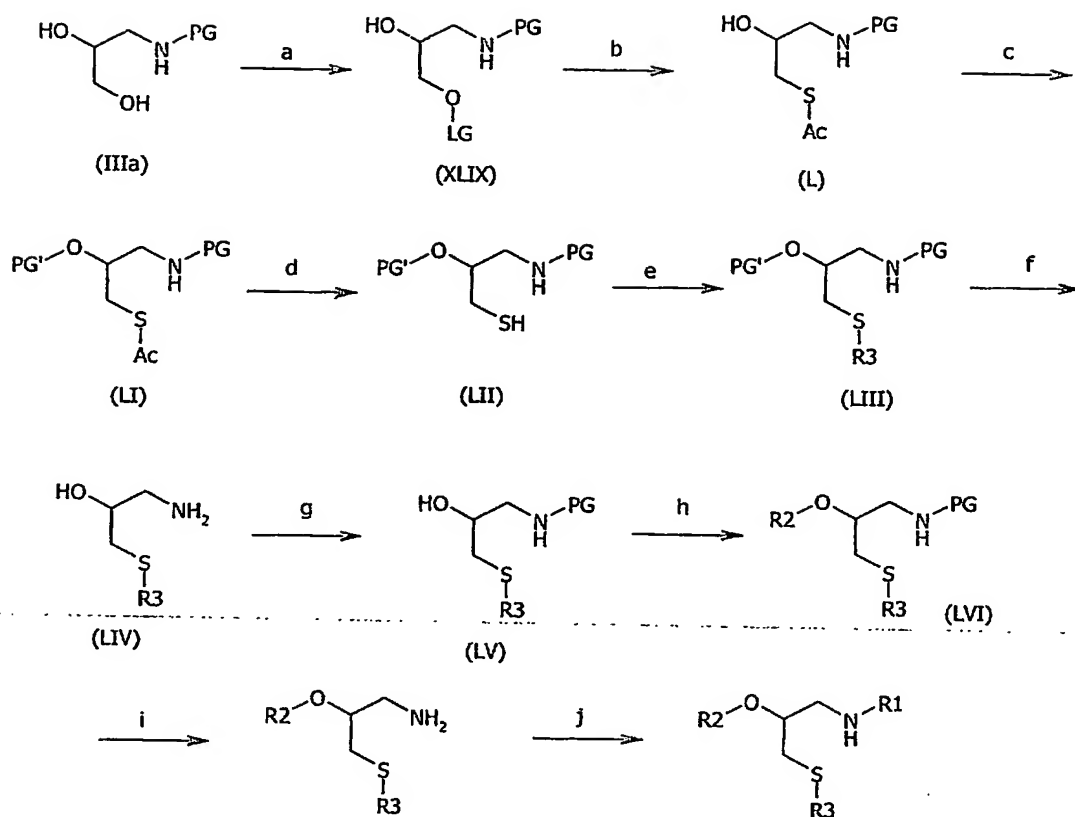
5 e) réaction d'un composé de formule générale (LII) avec un composé de formule $A^{\circ}\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule
10 générale (LIII) dans laquelle R3 représente un groupe CO-R5 ou CO- $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$;

f) déprotection d'un composé de formule (LIII), dans des conditions classiques connues de l'homme de métier, pour donner un composé de
15 formule générale (IB) dans laquelle G2 est un atome d'oxygène, G3 est un atome de soufre, R et R2 sont des atomes d'hydrogène et R3 représente un groupe CO-R5 ou CO- $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$ (composé LIV) ;

g) réaction d'un composé de formule (LIV) avec un composé $(\text{PG})_2\text{O}$ dans
20 lequel PG est un groupement protecteur pour donner un composé de formule générale (LV). La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par (Nazih, Cordier et al. 2000) et (Kotsovolou, Chiou et al. 2001) dans lesquels $(\text{PG})_2\text{O}$ représente le dicarbonate de di-tert-butyle ;

25 h) réaction d'un composé de formule générale (LV) avec un composé de formule $A^{\circ}\text{-CO-A2}$ dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe $(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R6}$, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs
30 connus de l'homme de métier pour obtenir un composé de formule (LVI) ;

- 5 i) déprotection d'un composé (LVI) dans des conditions classiques connues de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G3 est un atome de soufre, G2 est un atome d'oxygène, R et R1 sont des atomes d'hydrogène et R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 ;
- 10 j) réaction d'un composé de formule générale (I) dans laquelle G3 est un atome de soufre, G2 est un atome d'oxygène, R et R1 sont des atomes d'hydrogène et R2 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R5 ou CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R5 ou le groupe (CH₂)_{2n+1}-X-R6, en présence éventuellement d'agents de couplage ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



a. activation ; b. substitution ; c. protection ; d. déprotection ; e. acylation ; f. déprotection ; g : protection ; h : acylation ; i : déprotection ; j : amidification

schéma 12

5 La faisabilité, la réalisation et d'autres avantages de l'invention sont illustrés plus en détails dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

10 LEGENDE DES FIGURES :

Figure 1 : Structure de composés particuliers selon l'invention dont la préparation est décrite aux exemples 2, 4, 5, 6, 8 et 12 à 16 et notés sur la figure respectivement 1A.2, 1A.4, 1A.5, 1A.6, 1A.8, 1A.12, 1A.13, 1A.14, 1A.15 et 1A.16.

Figure 2 : Evaluation des propriétés d'agonistes PPAR α de composés selon l'invention avec le système de transactivation Gal4/PPAR α .

Figure 3 : Evaluation des effets de l'exemple 13 sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides plasmatiques chez le rat Zucker.

- 5
 - **Figure 3A :** dosage du cholestérol total plasmatique à J0, J7 et J14 chez les animaux contrôles et les animaux traités avec le composé Ex 13.
 - **Figure 3B :** dosage des triglycérides plasmatiques à J0, J7 et J14 chez les animaux contrôles et les animaux traités avec le composé Ex 13.

10 **Figure 4 :** Evaluation des propriétés antioxydantes de composés selon l'invention sur l'oxydation des LDL par le cuivre (Cu).

- **Figure 4A :** formation de diènes conjugués en fonction du temps ou Lag-Phase.
- **Figure 4B :** vitesse de d'oxydation des LDL.

- 15
 - **Figure 4C :** quantité maximum de diènes conjugués formés.

EXEMPLES :

20 Pour faciliter la lecture du texte, les composés selon l'invention utilisés dans les exemples de mesure ou d'évaluation d'activité seront notés de manière abrégée telle que « Ex 2 » pour désigner le composé selon l'invention dont la préparation est décrite à l'exemple 2.

25 Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice 60F₂₅₄ MERCK d'épaisseur 0.2 mm. On utilise l'abréviation R_f pour désigner le facteur de rétention (retention factor).

Les chromatographies sur colonne ont réalisées sur gel de silice 60 de granulométrie 40-63 μ m (référence 9385-5000 MERCK).

30 Les points de fusion (PF) ont été mesurés à l'aide d'un appareil BÜCHI B 540 par la méthode des capillaires.

Les spectres infra-rouge (IR) ont été réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier BRUKER (Vector 22).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AC 300 (300 MHz). Chaque signal est repéré par son déplacement chimique, son intensité, sa multiplicité (notée d pour doublet, dd pour doublet dédoublé, t pour triplet, td pour triplet dédoublé, quint pour quintuplet et m pour multiplet) et sa constante de couplage (J).

Les spectres de masse (SM) ont été réalisés sur un spectromètre PERKIN-ELMER SCIEX API 1 (ESI-MS pour Electrospray Ionization Mass Spectrometry) ou sur un spectromètre de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight).

EXEMPLE 1 : Préparation de l'acide tétradécylthioacétique

15 Evaluation des propriétés antioxydantes de composés selon l'invention sur l'oxydation des LDL par le cuivre (Cu). Au mélange réactionnel précédent est alors ajoutée une solution d'acide chlorhydrique concentré (60 ml) dissous dans l'eau (800 ml). L'acide tétradécylthioacétique précipite. Le mélange est laissé sous agitation une nuit à température ambiante. Le précipité est ensuite filtré, lavé cinq fois à l'eau puis séché au dessiccateur. Le produit est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 94%.

20 Rf (CH₂Cl₂-MeOH 9-1) : 0.60

PF: 67-68°C

IR: νCO acide 1726 et 1684 cm⁻¹

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.84-0.95 (t, 3H, -CH₃, J = 6.5 Hz) ; 1.20-1.45 (massif, 22H, -CH₂-) ; 1.55-1.69 (quint, 2H, -CH₂-CH₂-S-, J=6.5 Hz) ; 2.63-2.72 (t, 2H, CH₂-CH₂-S-, J = 7.3 Hz) ; 3.27 (s, 2H, S-CH₂-COOH)

25 SM (ESI-MS) : M-1 = 287

EXEMPLE 2 : Préparation du 3-(tétradécylthioacétylamino)propane-1,2-diol

30 L'acide tétradécylthioacétique (exemple 1) (14.393 g ; 50 mmol) et le 3-amino-propane-1,2-diol (5 g ; 55 mmol) sont placés dans un ballon et chauffés à 190°C pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante

puis repris par du chloroforme et lavé une fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 filtrée et portée à sec. Le résidu est placé sous agitation dans l'éther. Le produit est isolé par filtration.

Rendement : 22%.

5 Rf (CH_2Cl_2 -MeOH 9-1) : 0.60

PF : 89-92°C

IR: ν_{NH} et OH 3282 cm^{-1} ; ν_{COamide} 1640 cm^{-1}

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J = 6.5\text{ Hz}$) ; 1.26 (massif, 22H, $-\text{CH}_2-$) ;

1.57 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 2.54 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $J = 7.6\text{ Hz}$) ;

10 3.27 (s, 2H, $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 3.47 (m, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ; 3.58

(m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ; 3.81 (m, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ;

7.33 (sl, 1H, $-\text{CONH}-$).

SM (MALDI-TOF) : $M+1 = 362$ ($M+H$) ; $M+23 = 385$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 400$ ($M+\text{K}^+$)

15

EXEMPLE 3 : 3-(palmitoylamino)propane-1,2-diol

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 2) à partir du 3-amino-propane-1,2-diol et de l'acide palmitique.

20 Rendement : 86%

Rf (CH_2Cl_2 -MeOH 9-1) : 0.50

IR: ν_{NH} et OH 3312 cm^{-1} ; ν_{COamide} 1633 cm^{-1}

PF : 104-108°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J = 6.5\text{ Hz}$) ; 1.28 (massif, 24H, $-\text{CH}_2-$) ;

25 1.64 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$) ; 2.24 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 3.43 (m, 2H,

$-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ; 3.55 (m, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ; 3.78

(m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ; 5.82 (sl, 1H, $-\text{CONH}-$).

SM (MALDI-TOF) : $M+1 = 330$ ($M+H$)

30

EXEMPLE 4 : Préparation du 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-(dipalmitoyloxy)propane

Le 3-(tétradécylthioacétylamino)propane-1,2-diol (1 g ; 2.77 mmol) (exemple 2) est dissous dans le dichlorométhane (200 ml) puis la dicyclohexylcarbodiimide (1.426 g ; 6.91 mmol), la diméthylaminopyridine (0.845 g ; 6.91 mmol) et l'acide palmitique (1.773 g ; 6.91 mmol) sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 48 heures. Le précipité de dicyclohexylurée est filtré et lavé au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-cyclohexane 6-4) (rendement : 28%).

R_f (CH₂Cl₂-cyclohexane 7-3) : 0.28

PF : 73-75°C

IR: ν_{NH} 3295 cm⁻¹; CO_{ester} 1730 cm⁻¹; ν_{COamide} 1663 cm⁻¹

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 9H, -CH₃, J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 70H, -CH₂-) ; 1.57 (massif, 6H, -CH₂-CH₂-S- et OCOCH₂-CH₂-) ; 2.33 (t, 4H, OCOCH₂-CH₂-, J = 7.3 Hz) ; 2.51 (t, 2H, CH₂-CH₂-S-, J = 7.3 Hz) ; 3.22 (s, 2H, S-CH₂-CONH-) ; 3.47 (m, 1H, -CONH-CH_aH_b-CH-CH_cH_d-) ; 3.62 (m, 1H, -CONH-CH_aH_b-CH-CH_cH_d-) ; 4.12 (dd, 1H, -CH_aH_b-CH-CH_cH_d-, J=12.1 Hz et J=5.7 Hz) ; 4.36 (dd, 1H, -CH_aH_b-CH-CH_cH_d-, J = 12.1 Hz et J = 4.4 Hz) ; 5.15 (m, 1H, -CH_aH_b-CH-CH_cH_d-) ; 7.20 (m, 1H, -NHCO-).

SM (MALDI-TOF) : M+1 = 838 (M+H) ; M+23 = 860 (M+Na⁺) ; M+39 = 876 (M+K⁺)

EXEMPLE 5 : Préparation du 3-tétradécylthioacétylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 4) à partir du 3-(tétradécylthioacétylamino)propane-1,2-diol (exemple 2) et de l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1).

Rendement : 41%

R_f (CH₂Cl₂) : 0.23

IR: ν_{NH} 3308 cm⁻¹; CO_{ester} 1722 et 1730 cm⁻¹; ν_{COamide} 1672 cm⁻¹

PF : 65-67°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 9H, $-\text{CH}_3$, $J = 6.4$ Hz) ; 1.26 (massif, 66H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.59 (massif, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$) ; 2.53 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $J = 7.3$ Hz) ; 2.64 (t, 4H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$, $J = 7.3$ Hz) ; 3.23 (s, 4H, $\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$) ; 3.24 (s, 2H, $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 3.52 (m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$) ; 3.67 (m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$) ; 4.22 (dd, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$, $J=12.2$ Hz et $J=5.4$ Hz) ; 4.36 (dd, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$, $J = 12.2$ Hz et $J = 3.9$ Hz) ; 5.19 (m, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHaHb}-$) ; 7.18 (m, 1H, $-\text{NHCO}-$).

10 SM (MALDI-TOF) : $M+1 = 902$ ($M+H$) ; $M+23 = 924$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 940$ ($M+\text{K}^+$)

EXEMPLE 6 : Préparation du 3-palmitoylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 4) à partir du 3-(palmitoylamino)propane-1,2-diol (exemple 3) et de l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1).

Rendement : 8%

20 R_f (acétate d'éthyle-cyclohexane 2-8) : 0.33

IR: $\nu_{\text{NH}} 3319 \text{ cm}^{-1}$; $\text{CO}_{\text{ester}} 1735 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{COamide}} 1649 \text{ cm}^{-1}$

PF : 82-83°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 9H, $-\text{CH}_3$, $J = 6.4$ Hz) ; 1.26 (massif, 68H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.60 (massif, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 2.18 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $J=6.8$ Hz) ; 2.64 (massif, 4H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$) ; 3.22 (s, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$) ; 3.24 (s, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$) ; 3.47 (m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$) ; 3.62 (m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$) ; 4.23 (dd, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$, $J=11.9$ Hz et $J=5.6$ Hz) ; 4.36 (dd, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHcHd}-$, $J= 12.2$ Hz et $J=4$ Hz) ; 5.15 (m, 1H, $-\text{CHaHb}-\text{CH}-\text{CHaHb}-$) ; 5.85 (m, 1H, $-\text{NHCO}-$).

30 SM (MALDI-TOF) : $M+1 = 870$ ($M+H$)

EXEMPLE 7 : Préparation du 1,3-di(oléoylamino)propan-2-ol

L'acide oléique (5.698 g ; 0.020 mol) et le 1,3-diaminopropan-2-ol (1 g ; 0.011 mol) sont placés dans un ballon et chauffés à 190°C pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante puis repris par du chloroforme et lavé par de l'eau. La phase aqueuse est extraite par du chloroforme et les phases organiques sont groupées, séchées sur sulfate de magnésium puis filtrées et évaporées à sec pour fournir un résidu huileux noir (6.64 g) qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-méthanol 99-1). Le produit obtenu est ensuite lavé par de l'éther et filtré.

Rendement : 23%

R_f (CH₂Cl₂-MeOH 95-5) : 0.43

IR: ν_{NH} 3306 cm⁻¹; ν_{COamide} 1646 et 1630 cm⁻¹

PF : 88-92°C

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 6H, -CH₃, J = 6.2 Hz) ; 1.28 (massif, 68H, -CH₂-) ; 1.61-1.66 (massif, 4H, -CH₂-CH₂-CONH-) ; 1.98-2.02 (massif, 8H, -CH₂-CH=CH-CH₂-) ; 2.23 (t, 4H, -CH₂-CH₂-CONH-, J = 7.0 Hz) ; 3.25-3.42 (massif, 4H, -CONH-CH₂-CH-CH₂-) ; 3.73-3.80 (m, 1H, -CONH-CH₂-CH-CH₂-) ; 5.30-5.41 (massif, 4H, -CH₂-CH=CH-CH₂-) ; 6.36 (massif, 2H, -NHCO-).

SM (MALDI-TOF) : M+1 = 619 (M+H⁺) ; M+23 = 641 (M+Na⁺) ; M+39 = 657 (M+K⁺)

EXEMPLE 8 : Préparation du 1,3-di(tétradécylthioacétylamino)propan-2-ol

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 7) à partir du 1,3-diaminopropan-2-ol et de l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1).

Rendement : 94%

R_f (CH₂Cl₂-MeOH 95-5) : 0.44

IR: ν_{NH} 3275 cm⁻¹; ν_{COamide} 1660 et 1633 cm⁻¹

PF : 101-104°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 6H, $-\text{CH}_3$, $J = 6.3$ Hz) ; 1.28 (massif, 44H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.57-1.62 (massif, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) ; 2.55 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $J = 7.2$ Hz) ; 3.26 (s, 4H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$) , 3.32-3.36 (massif, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_a\text{H}_b-\text{CH}-\text{CH}_a\text{H}_b-\text{NHCO}-$) ; 3.43-3.49 (massif, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_a\text{H}_b-\text{CH}-\text{CH}_a\text{H}_b-\text{NHCO}-$) ; 3.82-3.84 (m, 1H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$) ; 7.44 (sl, 2H, $-\text{NHCO}-$).

SM (MALDI-TOF) : $M+23 = 653$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 669$ ($M+\text{K}^+$)

10 **EXEMPLE 9 : Préparation du 1,3-di(stéaroylamino)propan-2-ol**

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 7) à partir du 1,3-diaminopropan-2-ol et de l'acide stéarique.

Rendement : 73%

Rf (CH_2Cl_2 -MeOH 95-5) : 0.28

15 IR: νNH 3306 cm^{-1} ; $\nu\text{COamide}$ 1647 et 1630 cm^{-1}

PF : $123-130^\circ\text{C}$

SM (MALDI-TOF) : $M+23 = 645$ ($M+\text{Na}^+$)

20 **EXEMPLE 10 : Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)propan-2-ol**

Le 1,3-diaminopropan-2-ol (3 g ; 0.033 mol) est dissous dans du méthanol (300 ml) avant d'ajouter la triéthylamine (33 ml et goutte à goutte) et le dicarbonate de di-tert-butyle $[(\text{BOC})_2\text{O}]$ où BOC correspond à tertbutyloxycarbonyl (21.793 g ; 0.100 mol). Le milieu réactionnel est chauffé à 40-50°C pendant 20 min puis laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. Après évaporation du solvant, l'huile incolore résiduelle est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-méthanol 95-5). Le produit est obtenu sous forme d'huile incolore qui cristallise lentement.

30 Rendement : quantitatif

Rf (CH_2Cl_2 -MeOH 95-5) : 0.70

IR: νNH 3368 cm^{-1} ; $\nu\text{COcarbamate}$ 1690 cm^{-1}

PF : 98-100°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 1.45 (massif, 18H, $-\text{CH}_3-$ (BOC)) ; 3.02 (sl, 1H, OH) ; 3.15-3.29 (massif, 4H, $\text{BOCNH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHBOC}$) ; 3.75 (m, 1H, $\text{BOCNH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHBOC}$) ; 5.16 (massif, 2H, $-\text{NHBOC}$).

5 SM (MALDI-TOF) : $M+1 = 291$ ($M+\text{H}^+$) ; $M+23 = 313$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 329$ ($M+\text{K}^+$)

EXEMPLE 11 : Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane

10 Le 1,3-(di-tert-butoxycarbonylamino)-propan-2-ol (exemple 10) (1 g ; 3.45 mmol), l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1) (0.991 g ; 3.45 mmol) et la diméthylaminopyridine (0.042 g ; 0.34 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (40 ml) à 0°C puis la dicyclohexylcarbodiimide (0.709 g ;
15 3.45 mmol), diluée dans le dichlorométhane, est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 30 min puis est à température ambiante. Après 20 heures de réaction, le précipité de dicyclohexylurée est filtré. Le filtrat est porté à sec. Le résidu huileux est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-cyclohexane 5-5
20 puis dichlorométhane-acétate d'éthyle 98-2).

Rendement : 52%

Rf (CH_2Cl_2 -acétate d'éthyle 95-5) : 0.43

IR: ν_{NH} 3369 cm^{-1} ; ν_{CO} carbamate 1690 cm^{-1} ; ν_{CO} ester 1719 cm^{-1}

PF : huile incolore

25 RMN (^1H , CDCl_3) : 0.89 (t, 3H, CH_3 , $J=6.3$ Hz) ; 1.26 (massif, 22 H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.45 (massif, 18H, $-\text{CH}_3-$ (BOC)) ; 1.56-1.66 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CO}$) ; 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CO}$, $J=7.5$ Hz) ; 3.20 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CO}$) ; 3.35 (massif, 4H, $\text{BOCNH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHBOC}$) ; 4.89 (m, 1H, $\text{BOCNH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHBOC}$) ; 5.04 (massif, 2H, $-\text{NHBOC}$).

30 SM (MALDI-TOF) : $M+23 = 583$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 599$ ($M+\text{K}^+$)

EXEMPLE 12 : Préparation du 1,3-diamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane

Le 1,3-(di-*tert*-butoxycarbonylamino)-2-tétradécylthioacétyloxypropane (exemple 11) (0.800 g ; 1.43 mmol) est dissous dans de l'éther diéthylique (50 ml) saturé en HCl gaz. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Le précipité formé est ensuite filtré et lavé par de l'éther. Le produit est obtenu sous forme de dichlorhydrate.

Rendement : 88%

Rf (CH₂Cl₂-MeOH 7-3) : 0.37

10 IR: ν NH₂ 3049 et 3099cm⁻¹; ν CO_{ester} 1724 cm⁻¹

PF : 224°C (décomposition)

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.86 (t, 3H, CH₃, J = 6.3 Hz) ; 1.24 (massif, 22 H, -CH₂-) ; 1.48-1.55 (m, 2H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CO) ; 2.57 (t, 2H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CO, J = 7.2Hz) ; 3.16 (massif, 4H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NH) ; 3.56 (s, 2H, CH₂-S-CH₂-CO) ; 5.16 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NH) ; 8.43 (massif, 6H, -NH₂.HCl).
15 SM (MALDI-TOF) : M+1 = 361 (M+H⁺) ; M+23 = 383 (M+Na⁺) ; M+39 = 399 (M+K⁺)

20 **EXEMPLE 13 : Préparation du 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane**

Le dichlorhydrate de 1,3-diamino-2-tétradécylthioacétyloxypropane (exemple 12) (0.400 g ; 0.92 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1) (0.532 g ; 1.84 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (50 ml) à 0°C avant d'ajouter la triéthylamine (0.3 ml), la dicyclohexylcarbodiimide (0.571 g ; 2.77 mmol) et l'hydroxybenzotriazole (HOBT) (0.249 g ; 1.84 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 48 heures. Le précipité de dicyclohexylurée est filtré et rincé par du dichlorométhane. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu obtenu (1.40 g) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane 10 puis dichlorométhane-acétate d'éthyle 9-1).

30 Rendement : 74%

Rf (CH₂Cl₂-acétate d'éthyle 8-2) : 0.25

IR: ν_{NH} 3279 et 3325⁻¹; ν_{COester} 1731 cm⁻¹; ν_{COamide} 1647 et 1624 cm⁻¹

PF : 87-89°C

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 9H, CH₃, J = 6.6 Hz) ; 1.26 (massif, 66H, -CH₂-) ; 1.55-
 5 1.60 (massif, 6H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CO) ; 2.55 (t, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CONH-,
 J=7.2 Hz) ; 2.65 (t, 2H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COO-, J = 7.2 Hz) ; 3.21 (s, 2H, -CH₂-
 S-CH₂-COO-) ; 3.25 (s, 4H, -CH₂-S-CH₂-CONH-) ; 3.40-3.49 (m, 2H, -CONH-
 CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHCO-) ; 3.52-3.61 (m, 2H, -CONH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-
 NHCO-) ; 4.96 (m, 1H, -CONH-CH₂-CH-CH₂-NHCO-) ; 7.42 (massif, 2H,
 10 -NHCO-).

SM (MALDI-TOF) : M+1 = 901 (M+H⁺) ; M+23 = 923 (M+Na⁺) ; M+39 = 939
 (M+K⁺)

15 EXEMPLE 14 : Préparation du 1,3-dioléoylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane

Le produit est obtenu selon la procédure décrite exemple 13 à partir du dichlorhydrate de 1,3-diamino-2-tétradécylthioacétyloxypropane (exemple 12) et de l'acide oléique.

20 Rendement : 15%

Rf (CH₂Cl₂-acétate d'éthyle 8-2) : 0.38

IR: ν_{NH} 3325⁻¹; ν_{COester} 1729 cm⁻¹; ν_{COamide} 1640 et 1624 cm⁻¹

PF : 57-59°C

RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 9H, CH₃, J = 6.6 Hz) ; 1.26 (massif, 62H, -CH₂-) ;
 25 1.59-1.74 (massif, 6H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CO) ; 1.92-2.03 (massif, 8H, -CH₂-
 CH=CH-CH₂-) ; 2.22 (t, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CONH-, J = 7.2 Hz) ; 2.65 (t, 2H,
 -CH₂-CH₂-S-CH₂-COO-, J=7.4 Hz) ; 3.19 (s, 2H, -CH₂-S-CH₂-COO-) ; 3.25-3.34
 (m, 2H, -CONH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHCO-) ; 3.56-3.65 (m, 2H, -CONH-CH_aH_b-
 CH-CH_aH_b-NHCO-) ; 4.87 (m, 1H, -CONH-CH₂-CH-CH₂-NHCO-) ; 5.34 (massif,
 30 4H, -CH₂-CH=CH-CH₂-) ; 6.27 (massif, 2H, -NHCO-).

SM (MALDI-TOF) : M+1 = 889 (M+H⁺) ; M+23 = 912 (M+Na⁺)

EXEMPLE 15 : Préparation du 1,3-di(tétradécylthioacétylamino)-2-(tétradécylthioacétylthio)propane

5 *Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)-2-(p-toluènesulfonyloxy)propane (exemple 15a)*

Le 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)propan-2-ol (exemple 10) (2.89 g ; 10 mmol) et la triéthylamine (2.22 ml ; 16 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane anhydre (100 ml). Le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace avant d'ajouter goutte à goutte le chlorure de tosyloxy (2.272 g ; 12 mmol) dissous dans du dichlorométhane (30 ml). Après addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 72 heures. 1 équivalent de chlorure et 1.6 de triéthylamine sont ajoutés au bout de 48 heures. De l'eau est ajoutée pour stopper la réaction et le milieu est décanté. Le phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau. Les phases aqueuses sont groupées et reextraites par du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le résidu obtenu (6.44 g) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane 10 puis dichlorométhane-méthanol 99-1) et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme de solide blanc.

Rendement : 48%

R_f (CH_2Cl_2 -MeOH 98-2) : 0.70

IR: ν_{NH} 3400 cm^{-1} ; ν_{COester} 1716 cm^{-1} ; $\nu_{\text{COcarbamate}}$ 1689 cm^{-1}

25 PF : 104-111°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 1.42 (s, 18H, CH_3 (BOC)) ; 2.46 (s, 3H, CH_3) ; 3.22 et 3.41 (massif, 4H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NHBOC}$) ; 4.56 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NHBOC}$) ; 5.04-5.11 (massif, 2H, -NHBOC) ; 7.36 (d, 2H, aromatiques, $J = 8.5$ Hz) ; 7.36 (d, 2H, aromatiques, $J = 8.5$ Hz).

30 SM (MALDI-TOF) : $M+23 = 467$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 483$ ($M+\text{K}^+$)

Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)-2-acétylthiopropane (exemple 15b)

Le 1,3-(di-tert-butoxycarbonylamino)-2-(p-toluènesulfonyloxy)propane (exemple 15a) (0.500 g ; 1.12 mmol) et le thioacétate de potassium (0.161 g ; 1.41 mmol) sont dissous dans l'acétone et le milieu est porté à reflux pendant 48 heures. Un équivalent de thioacétate de potassium est ajouté après 24 heures de reflux. La réaction est ramenée à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris par de l'éther diéthylique et filtré sur célite. Le filtrat est évaporé. Le produit obtenu (0.48 g) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-acétate d'éthyle 98-2) et permet d'obtenir le produit souhaité sous forme de solide ocre.

Rendement : 84%

R_f (CH₂Cl₂-MeOH 98-2) : 0.45

IR: ν_{NH} 3350 cm⁻¹ ; ν_{COester} 1719 cm⁻¹ ; ν_{COcarbamate} 1691 cm⁻¹

PF : 93-96°C

RMN (¹H, CDCl₃) : 1.45 (s, 18H, CH₃ (BOC)) ; 2.34 (s, 3H, CH₃) ; 3.23-3.32 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.38-3.43 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.58-3.66 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NHBOC) ; 5.22 (massif, 2H, -NHBOC).

SM (MALDI-TOF) : M+23 = 371 (M+Na⁺).

Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)-2-mercaptopropane (exemple 15c)

A une solution de KOH 20% dans le méthanol (2.14 ml ; 12.4 mmol), désoxygénée par un courant d'azote, est ajouté le 1,3-di(tert-butoxycarbonylamino)-2-(acétylthio)propane (exemple 15b) (0.380 g ; 1.2 mmol) dilué dans du méthanol (10 ml). Le mélange réactionnel est maintenu sous azote et sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Le milieu est alors acidifié (pH=6) par de l'acide acétique puis les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par de l'eau et extrait par du chloroforme. Les phases

organiques sont groupées, séchées sur MgSO_4 puis filtrées et évaporées pour donner le produit souhaité sous forme de solide blanc qui est rapidement remis en réaction.

Rendement : 90%

5 Rf (CH_2Cl_2 -MeOH 98-2) : 0.56

IR: ν_{NH} 3370 cm^{-1} ; ν_{CO} carbamate 1680 cm^{-1}

RMN (^1H , CDCl_3) : 1.46 (s, 18H, CH_3 (BOC)) ; 2.98-3.12 (massif, 3H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$ et $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NHBOC}$) ; 3.46-3.50 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 5.27 (massif, 2H, -NHBOC).

10

Préparation du 1,3-di(tert-butyloxycarbonylamino)-2-(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 15d)

Le 1,3-[di(tert-butoxycarbonylamino)]-2-mercaptopropane (exemple 15c) (0.295 g ; 0.963 mmol) est dissous dans le dichlorométhane (40 ml) avant d'ajouter la dicyclohexylcarbodiimide (0.199 g ; 0.963 mmol), la diméthylaminopyridine (0.118 g ; 0.963 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1) (0.278 g ; 0.963 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince. Après 20 heures de réaction, le précipité de dicyclohexylurée est filtré, rincé au dichlorométhane et le filtrat est évaporé. Le résidu obtenu (0.73 g) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane 10) et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme de poudre blanche.

25 Rendement : 72%

Rf (CH_2Cl_2 -acétate d'éthyle 95-5) : 0.29

IR: ν_{NH} 3328 cm^{-1} ; ν_{CO} thioester 1717 cm^{-1} ; ν_{CO} carbamate 1687 cm^{-1}

PF : 47-51°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.88 (t, 9H, CH_3 , $J = 6.1$ Hz) ; 1.26 (massif, 22H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.44 (s, 18H, CH_3 (BOC)) ; 1.53-1.65 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CO-}$) ; 2.59 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-COS-}$, $J = 7.8$ Hz) ; 3.21-3.30 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 3.40 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-COS-}$) ; 3.42-3.49 (m, 2H, BOCNH-

30

$\text{CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 3.62-3.65 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NHBOC}$) ; 5.24 (massif, 2H, -NHBOC).

SM (MALDI-TOF) : $M+23 = 599$ ($M+\text{Na}^+$) ; $M+39 = 615$ ($M+\text{K}^+$)

5

Préparation du 1,3-diamino-2-(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 15e)

Le 1,3-[di(*tert*-butoxycarbonylamino)]-2-tétradécylthioacétylthiopropane (exemple 15d) (0.300 g ; 0.52 mmol) est dissous dans l'éther saturé en HCl gaz (55 ml). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante. Après 96 heures de réaction, le précipité formé est filtré, rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique et séché pour donner le composé souhaité sous forme de dichlorhydrate (poudre blanche).

Rendement : 59%

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH 9-1}$) : 0.11

15 IR: $\nu\text{NH.HCl } 2700\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{CO thioester } 1701\text{ cm}^{-1}$

PF : 181°C (décomposition)

RMN (^1H , CDCl_3) : 0.86 (t, 9H, CH_3 , $J = 6\text{ Hz}$) ; 1.24 (massif, 22H, $-\text{CH}_2-$) ; 1.49-1.54 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CO}$) ; 2.59 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-COS-}$) ; 2.80-2.84 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 3.03-3.09 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 3.14 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-COS-}$) ; 3.27-3.38 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_a\text{H}_b\text{-CH-CH}_a\text{H}_b\text{-NHBOC}$) ; 3.86-3.90 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NHBOC}$) ; 8.21 et 8.52 (2m, 2H+4H, NH.HCl).

25 *Préparation du 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 15)*

Le dichlorhydrate de 1,3-diamino-2-tétradécylthioacétylthiopropane (100 mg ; 0.225 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1) (130 mg ; 0.450 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (30 ml) à 0°C avant d'ajouter la triéthylamine (68 μl), la dicyclohexylcarbodiimide (139 mg ; 0.675 mmol) et hydroxybenzotriazole (61 mg ; 0.450 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 48

heures. Le précipité de dicyclohexylurée est filtré et rincé par du dichlorométhane et le filtrat est évaporé. Le résidu obtenu (430 mg) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-acétate d'éthyle 95-5) et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme de poudre blanche.

5 Rendement : 82%

Rf (CH₂Cl₂-MeOH 98-2) : 0.54

IR: ν CO thioester 1660 cm⁻¹; ν CO amide 1651 cm⁻¹

PF : 83-85°C

10 RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 9H, CH₃, J = 6.6 Hz) ; 1.26 (massif, 66H, -CH₂-) ;
1.56-1.62 (massif, 62H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CO) ; 2.56 (t, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-
CONH-, J = 7.5 Hz) ; 2.61 (t, 2H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-, J = 7 Hz) ; 3.26 (s, 4H,
CH₂-S-CH₂-CONH-) ; 3.42 (s, 2H, CH₂-S-CH₂-COS-) ; 3.44-3.49 (m, 2H,
-CONH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NH-CO) ; 3.55-3.61 (m, 2H, -CONH-CH_aH_b-CH-
CH_aH_b-NHCO-) ; 3.70-3.71 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NHBOC) ; 7.58-7.62
15 (m, 2H, NHCO).

SM (MALDI-TOF) : M+1 = 917 (M+H⁺) ; M+23 = 939 (M+Na⁺)

20 **EXEMPLE 16 : Préparation du 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane**

Préparation du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-propane-2,3-diol (exemple 16a)

25 Le 1,3-diaminopropan-2-ol (5 g ; 55 mmol) est dissous dans le méthanol (200 ml) avant d'ajouter goutte à goutte la triéthylamine (0.5 ml par mmol d'amine) et l'anhydride de boc (17.97 g ; 82 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 40-50°C pendant 20 min puis laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. Après évaporation du solvant, l'huile incolore résiduelle est purifiée par chromatographie sur gel de silice avec l'éluant dichlorométhane-méthanol 95-5 et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme d'huile
30 incolore qui cristallise lentement.

Rendement : 99%

Rf (CH₂Cl₂-MeOH 9-1) : 0.39

IR: ν_{NH} 3350 cm^{-1} ; ν_{COester} 1746 cm^{-1} ; ν_{COamide} 1682 cm^{-1}

PF < 15°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 1.44 (s, 9H, CH_3 (BOC)) ; 3.16-3.31 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$) ; 3.44 (massif, 2H, OH) ; 3.16-3.31 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$) ; 3.71-3.78 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$) ; 5.24 (m, 1H, -NHBOC).
 SM (MALDI-TOF) : $\text{M}+23 = 214$ ($\text{M}+\text{Na}^+$)

10 *Préparation du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-di(p-toluènesulfonyloxy)propane (exemple 16b)*

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 15a) à partir du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-propane-2,3-diol (composé 16a) et du chlorure de p-toluènesulfonyle. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Rendement : 45%

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 98-2) : 0.49

IR : ν_{NH} 3430 cm^{-1} ; $\nu_{\text{CO ester et carbamate}}$ 1709 cm^{-1}

20 PF : 112-116°C

RMN (^1H , CDCl_3) : 1.40 (s, 9H, CH_3 (BOC)) ; 2.46 (s, 6H, CH_3) ; 3.26-3.45 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OTs}$) ; 4.04-4.14 (m, 2H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OTs}$) ; 4.68 (m, 1H, $\text{BOCNH-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OTs}$) ; 4.71 (s, 1H, -NHBOC) ; 7.34 (d, 4H, aromatiques, $J = 8.5$ Hz) ; 7.69 (d, 2H, aromatiques, $J = 8.1$ Hz) ; 7.76 (d, 2H, aromatiques, $J = 8.1$ Hz).

25 SM (MALDI-TOF) : $\text{M}+23 = 522$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) ; $\text{M}+39 = 538$ ($\text{M}+\text{K}^+$)

30 *Préparation du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-di(acétylthio)propane (exemple 16c)*

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 15b) à partir du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-di(p-toluènesulfonyloxy)-

propane (composé 16b) et du thioacétate de potassium. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 59%

Rf (CH₂Cl₂-acétate d'éthyle 95-5) : 0.55

5 IR : ν_{NH} 3430 cm⁻¹ ; ν_{CO} thioester 1718 cm⁻¹ ; ν_{CO} carbamate 1690 cm⁻¹

PF : 62-63°C

RMN (¹H, CDCl₃) : 1.45 (s, 9H, CH₃ (BOC)) ; 2.35 (s, 3H, CH₃) ; 2.37 (s, 3H, CH₃) ; 3.12-3.38 (massif, 4H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-SCO-) ; 3.69-3.78 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-SCO-) ; 5.02 (s, 1H, -NHBOC).

10 SM (MALDI-TOF) : M+23 = 330 (M+Na⁺)

Préparation du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-dimercaptopropane (exemple 16d)

15

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 15c) par saponification du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-di(acétylthio)propane (composé 16c). Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc qui est rapidement remis en réaction.

20 Rendement : 95%

Rf (CH₂Cl₂-acétate d'éthyle 95-5) : 0.45

IR : ν_{NH} 3368 cm⁻¹ ; ν_{CO} carbamate 1688 cm⁻¹

PF : 62-63°C

25 RMN (¹H, CDCl₃) : 1.46 (s, 9H, CH₃ (BOC)) ; 3.04-3.11 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CHSH-CH₂-SH) ; 3.26-3.35 (m, 2H, BOCNH-CH₂-CHSH-CH₂-SH) ; 3.43-3.52 (m, 2H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-SH) ; 4.91 (m, 2H, SH) ; 5.08 (s, 1H, -NHBOC).

Préparation du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 16e)

30

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 15d) à partir du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-dimercaptopropane (composé 16d) et de l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1). Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc.

5 Rendement : 50%

R_f (CH₂Cl₂) : 0.38

IR : νNH 3421 cm⁻¹ ; νCO thioester 1721 cm⁻¹ ; νCO carbamate 1683 cm⁻¹

PF : 60-62°C

10 RMN (¹H, CDCl₃) : 0.87 (t, 6H, CH₃, J = 6.3 Hz) ; 1.26 (massif, 44H, -CH₂-) ; 1.45 (s, 9H, CH₃ (BOC)) ; 1.57-1.62 (m, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-) ; 2.60 (t, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-, J = 6.9 Hz) ; 3.17-3.29 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.29-3.38 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.41 (s, 2H, CH₂-S-CH₂-COS-) ; 3.43 (s, 2H, CH₂-S-CH₂-COS-) ; 3.76-3.80 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NHBOC) ; 5.03 (s, 1H, -NHBOC).

15 SM (MALDI-TOF) : M+23 = 786 (M+Na⁺)

Préparation du 1-amino-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 16f)

20 Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 15e) à partir du 1-(tert-butyloxycarbonylamino)-2,3-ditétradécylthioacétylthiopropene (composé 16e). Le produit est obtenu sous forme de chlorhydrate (solide blanc).

Rendement : 43%

25 R_f (CH₂Cl₂) : 0.19

IR : νNH.HCl 2700-3250 cm⁻¹ ; νCO thioester 1701 et 1676 cm⁻¹

PF : 117-128°C

30 RMN (¹H, CDCl₃) : 0.86 (t, 6H, CH₃, J = 6 Hz) ; 1.24 (massif, 44H, -CH₂-) ; 1.51 (m, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-) ; 2.61 (m, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-) ; 2.93-3.04 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.11-3.20 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.59-3.63 (massif, 4H, CH₂-S-CH₂-COS-) ; 3.72-3.84 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NHBOC) ; 8.12 (m, 3H, NH₂.HCl).

Préparation du 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane (exemple 16)

- 5 Le chlorhydrate de 1-amino-2,3-ditétradécylthioacétylthiopropane (100 mg ; 0.140 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique (62 mg ; 0.210 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (40 ml) à 0°C avant d'ajouter la triéthylamine (43ml), la dicyclohexylcarbodiimide (59 mg ; 0.28 mmol) et l'HOBT (29 mg ; 0.210 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 heure puis à
- 10 température ambiante pendant 24 heures. Le milieu est ensuite chauffé à reflux léger pendant 48 heures puis porté à sec. Le résidu obtenu (310 mg) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-cyclohexane 8-2) et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme de poudre blanche.

Rendement : 96%

- 15 R_f (CH₂Cl₂) : 0.20

IR : ν_{NH} amide 3306 cm⁻¹ ; ν_{CO} thioester 1674 cm⁻¹ ; ν_{CO} amide 1648 cm⁻¹

PF : 78-80°C

- RMN (¹H, CDCl₃) : 0.89 (t, 9H, CH₃, J = 6.6 Hz) ; 1.26 (massif, 66H, -CH₂) ; 1.58-1.62 (massif, 6H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-) ; 2.56 (t, 4H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-COS-, J = 7.5 Hz) ; 2.61 (t, 2H, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CONH-, J = 7 Hz) ; 3.26 (s, 4H, CH₂-S-CH₂-COS-) ; 3.42 (s, 2H, CH₂-S-CH₂-CONH-) ; 3.44-3.49 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.55-3.61 (m, 2H, BOCNH-CH_aH_b-CH-CH_aH_b-NHBOC) ; 3.70-3.71 (m, 1H, BOCNH-CH₂-CH-CH₂-NHBOC) ; 7.58-7.62 (m, 1H, NHCO).
- 25 SM (MALDI-TOF) : M+1 = 934 (M+H⁺) ; M+23 = 956 (M+Na⁺) ; M+39 = 972 (M+K⁺)

EXEMPLE 17 : Méthode de préparation des composés selon l'invention.

- 30 Pour conduire les expériences *in vitro* décrites dans les exemples suivants, les composés selon l'invention ont été préparés sous forme d'une émulsion telle que décrite ci-après.

L'émulsion comprenant un composé selon l'invention et de la phosphatidylcholine (PC) est préparée selon le protocole de Spooner et al (Spooner, Clark et al. 1988). Le composé selon l'invention est mélangé à la PC selon un rapport 4:1 (w/w) dans du chloroforme, la mixture est séchée sous azote, puis évaporée toute la nuit sous vide, la poudre qui en résulte est reprise par 0,16 M de KCl contenant 0,01 M d'EDTA puis les particules lipidiques sont dispersées par ultra-sons pendant 30 minutes à 37°C. Les liposomes formés sont ensuite séparés par ultracentrifugation (ultracentrifugeuse XL 80, Beckman Coulter, Villepinte, France) à 25000 tr/m pendant 45 minutes pour récupérer les liposomes dont la taille est supérieure à 100 nm et se rapproche de celle des chylomicrons. Des liposomes constitués uniquement de PC sont préparés en parallèle pour servir de témoin négatif.

La composition des liposomes en composé selon l'invention est estimée en utilisant le kit de dosage enzymocolorimétrique des triglycérides. Le dosage est effectué contre une gamme standard, préparée grâce au calibrateur des lipides CFAS Réf. N° 759350 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne). La gamme standard a été construite de 16 à 500 µg/ml. 100 µl de chaque dilution d'échantillon ou de gamme étalon sont déposés par puits d'une plaque de titration (96 puits). Ensuite 200 µl de réactifs triglycérides Réf. 701912 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) sont rajoutés dans chaque puits, et l'ensemble de la plaque est incubée pendant 30 min. à 37°C. La lecture des Densités Optiques (DO) est effectuée à 492 nm sur le spectrophotomètre. Les concentrations en triglycérides de chaque échantillon sont calculées après construction de la courbe étalon selon une fonction linéaire $y=ax+b$, où y représente les DO et x les concentrations en triglycérides.

Les liposomes contenant les composés selon l'invention, ainsi préparés sont utilisés dans les expériences *in vitro* décrites dans les exemples suivants

EXEMPLE 18 : Evaluation de l'activation des PPARs *in vitro*

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

Les récepteurs nucléaires membres de la sous-famille des PPARs qui sont
5 activés par deux classes majeures de composés pharmaceutiques, les fibrates et les glitazones, abondamment utilisées en clinique humaine pour le traitement des dyslipidémies et du diabète, jouent un rôle important dans l'homéostasie lipidique et glucidique. Les données expérimentales suivantes montrent que les composés selon l'invention activent PPAR α *in vitro*.

- 10 L'activation des PPARs est évaluée *in vitro* dans des lignées de type fibroblastique RK13 ou dans une lignée hépatocytaire HepG2, par la mesure de l'activité transcriptionnelle de chimères constituées du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 de levure et du domaine de liaison du ligand des différents PPARs. L'exemple présenté ci-dessous est donné pour les
15 cellules HepG2.

A-/Protocoles de culture

- Les cellules HepG2 proviennent de l'ECACC (Porton Down, UK) et sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% vol/vol sérum de veau
20 foetal, 100 U/ml pénicilline (Gibco, Paisley, UK) et 2 mM L-Glutamine (Gibco, Paisley, UK). Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Les cellules sont conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 95% d'air.

25 B-/Description des plasmides utilisés en transfection

- Les plasmides pG5TkpGL3, pRL-CMV, pGal4-hPPAR α , pGal4-hPPAR γ et pGal4-f ont été décrits par (Raspe, Madsen et al. 1999). Les constructions pGal4-mPPAR α et pGal4-hPPAR β sont obtenues par clonage dans le vecteur pGal4-f de fragments d'ADN amplifiés par PCR correspondants aux domaines
30 DEF des récepteurs nucléaires PPAR α de souris et PPAR β humain respectivement.

C-/Transfection

Les cellules HepG2 sontensemencées dans des boîtes de culture de 24 puits à raison de 5×10^4 cellules/puit et sont transfectées pendant 2 heures avec le plasmide rapporteur pG5TkpGL3 (50 ng/puit), les vecteurs d'expression pGal4-f ou pGal4-mPPAR α ou pGal4-hPPAR α ou pGal4-hPPAR γ ou pGal4-hPPAR β (100 ng/puit) et le vecteur de contrôle de l'efficacité de transfection pRL-CMV (1 ng/puit) suivant le protocole décrit précédemment (Raspe, Madsen et al. 1999) et incubées pendant 36 heures avec les composés testés. A l'issue de l'expérience, les cellules sont lysées (Gibco, Paisley, UK) et les activités luciférase sont déterminées à l'aide du kit de dosage Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) selon la notice du fournisseur. Le contenu en protéines des extraits cellulaires est ensuite évalué à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) selon la notice du fournisseur.

Les inventeurs mettent en évidence une augmentation de l'activité luciférase dans les cellules traitées avec les composés selon l'invention et transfectées avec le plasmide pGal4-hPPAR α . Cette induction de l'activité luciférase indique que les composés selon l'invention, sont des activateurs de PPAR α . Un exemple de résultats obtenus avec des composés selon l'invention est présenté dans la figure 2.

Figure 2 : les cellules HepG2, transfectées avec les plasmides du système Gal4/PPAR α , sont incubées avec différentes concentrations (5, 15, 50 et 100 μ M) des composés selon l'invention (Ex 2, Ex 4, Ex 5, Ex 6, Ex 13) pendant 24h ainsi qu'avec différentes concentrations de véhicule (PC) notées 1, 2, 3, 4 à titre de contrôles respectivement pour les concentrations 5, 15, 50 et 100 μ M des composés selon l'invention (suivant le rapport 4 :1 w/w décrit dans l'exemple 17 (Méthode de préparation des composés selon l'invention)). Les résultats sont représentés par le facteur d'induction (signal luminescent des cellules traitées divisé par le signal luminescent des cellules non traitées) en fonction des différents traitements. Plus le facteur d'induction est élevé meilleure est la propriété d'agoniste pour PPAR α . Les résultats montrent que le composé selon

l'invention Ex 2 favorise l'induction du signal luminescent d'un facteur maximal de 19,8 à 50 μ M, de 19,2 à 100 μ M, de 7,7 à 15 μ M et de 1,5 à 5 μ M. Le composé selon l'invention Ex 5 induit également une augmentation du facteur d'induction avec un effet dose de 10,5 à 100 μ M, 7 à 50 μ M, 2,5 à 15 μ M et 1,2 à 5 μ M. Le composé selon l'invention Ex 6 induit aussi une augmentation du signal luminescent, révélateur d'une activité sur le récepteur nucléaire PPAR α . Les facteurs d'induction pour le composé Ex 6 sont de 14,5 à 100 μ M, 9,6 à 50 μ M, 2,2 à 15 μ M et 1,1 à 5 μ M. En revanche lorsque les cellules sont incubées avec le véhicule (liposome de PC) aucune induction significative n'est observée.

Ces résultats montrent que les composés selon l'invention testés possèdent, de manière significative, la propriété de ligand vis-à-vis de PPAR α et permettent aussi son activation au niveau transcriptionnel.

D-/ Analyse des ARN

Les ARN messagers sont extraits des cellules HepG2 à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene, France) suivant les instructions du fournisseur, dosés par spectrophotométrie et quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I kit (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cycler System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ACO et Apo AII, cibles de PPAR α sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I ci-dessous).

Tableau I :

nom	séquence	PCR semi quantitative		PCR quantitative		gène
		Tm	nbr cycle	Tm	nbr cycle sortie	
ApoAI r l s 741	GCCTGAATCTCCTGG ACAACCTG	58°C	25	58°C	18 à 20	Apo AI
ApoAI r l as 742	ATGCCTTTGCATCTC CTTCG					
ApoB r l s 743	ATACAGCCTGAGTGA GCCTCTTCAG	55°C	30	X	X	Apo B
ApoB r l as 744	CCAGGGAGTTGGAGA CCGTG					
GAPDH h l s 390	GACATCAAGAAGGTG GTGAA	55°C	25	55°C	20 (variable)	GAPDH
GAPDH h l as 389	CCACATACCAGGAAA TGAGC					
beta-actine h l s 189	TTCAACTCCATCATG AAGTGTGAC	55°C	25	55°C	variable	β actine
beta-actine h l as 188	TCGTCATACTCCTTG CTTGCTGATCC					
CPT1 r l s 517	GCTGGCTTATCGTGG TGGTG	60°C	25	60°C	20 à 25	CPT-I
CPT1 r l as 516	GACCTGAGAGGACCT TGACC					
36B4 h l s 177	CATGCTCAACATCTC CCCCTTCTCC	X	X	55°C	23	36B4
36B4 h l as 178	GGGAAGGTGTAATCC GTCTCCACAG					
ACOX1 r l as 457	CGCATCCATTTCTCC TGCTG	60°C	25	60°C	18 à 24	ACO
ACOX1 r l s 458	TTCTGTGCGCCACCTC CTCTG					
ApoCIII r l s 797	ATGCAGCCCCGAATG CTCCTCATCGTGG	55°C	30	55°C	28 à 30	Apo CIII
ApoCIII r l as 798	TCACGGCTCAAGAGT TGGTGTTAC					
CPT2 r l s 725	CAGAAGCCTCTCTTG GATGACAG	55°C	25	X	X	CPT-II
CPT2 r l as 726	TTGGTTGCCCTGGTA AGCTG					
ABCA1 h 2 s	CTGAGGTTGCTGCTG TGGAAG	65°C	21	X	X	ABCA1
ABCA1 h 2 as	CATCTGAGAACAGGC GAGCC					

Les résultats obtenus confirment que les composés testés sont capables d'activer très fortement le récepteur nucléaire PPAR α (résultats non montrés).

EXEMPLE 19 : Evaluation des effets sur le métabolisme lipidique *in vivo*

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est
5 décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

Les fibrates, abondamment utilisés en clinique humaine pour le traitement des
dyslipidémies impliquées dans le développement de l'athérosclérose, une des
principales causes de mortalité et de morbidité dans les sociétés occidentales,
10 sont de puissants activateurs du récepteur nucléaire PPAR α . Celui-ci régule
l'expression de gènes impliqués dans le transport (apolipoprotéines telles que
Apo AI, ApoAII et ApoC-III, transporteurs membranaires tels que FAT) ou le
catabolisme des lipides (ACO, CPT-I ou CPT-II). Un traitement par les
activateurs de PPAR α se traduit donc chez le rongeur par une diminution des
15 taux circulants de cholestérol et de triglycérides.

Les protocoles suivants permettent de mettre en évidence une baisse du taux de
triglycérides et du taux de cholestérol circulant, ainsi que l'intérêt des composés
selon l'invention dans le cadre de la prévention et/ou du traitement des maladies
20 cardio-vasculaires.

1) Traitement des animaux

Des rats Sprague-Dawley de 200 à 230 g (Charles River, L'Arbresle, France)
25 sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température
constante de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Après une acclimatation d'une semaine, les rats sont
pesés et rassemblés par groupes de 8 animaux sélectionnés de telle sorte que la
distribution de taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides soient
uniformes. Les composés testés sont suspendus dans un véhicule
30 (carboxyméthylcellulose 0,5% (CMC) et Tween 0,1%) et administrés par gavage
intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 15 jours aux doses
indiquées. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. A l'issue de

l'expérience les animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie après un jeûne de 5 heures. Le sang est collecté sur EDTA. Le plasma est préparé par centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes. Des échantillons de foie sont prélevés et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyse ultérieure.

- 5 La carboxyméthylcellulose utilisée est un sel de sodium de carboxyméthylcellulose de viscosité moyenne (Ref. C4888, Sigma-aldrich, France). Le Tween utilisé est le Polyoxyéthylènesorbitan Monooleate (Tween 80, Ref. P8074, Sigma-aldrich, France)

10 2) Mesure des lipides et apolipoprotéines sériques

Les concentrations plasmatiques des lipides (cholestérol total et triglycérides) sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur. Les concentrations plasmatiques des

- 15 apolipoprotéines AII, AI et CIII sont mesurées selon les méthodes décrites précédemment (Raspe, Madsen et al. 1999) et (Asset, Staels et al. 1999).

Pour séparer les lipoprotéines selon leur taille, 300 µL de plasma sont injectés sur une colonne Sepharose 6HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et élués à flux constant (0,2 ml/minute) avec du PBS (pH 7,2). La densité optique de

20 l'effluent est enregistrée à 280 nm. L'effluent est collecté par fraction de 0,3 ml. Les concentrations de lipides dans les différentes fractions sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 3A et 3B.

- 25 Sur la figure 3A sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 13 (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique de cholestérol total. La figure 3A montre que le taux de cholestérol total plasmatique est diminué par le traitement des animaux avec l'exemple 13.

Sur la figure 3B sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-

30 Dawley avec l'exemple 13 (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique de triglycérides. La figure 3B montre que le taux de triglycérides plasmatiques est diminué par le traitement des animaux avec l'exemple 13.

Pour séparer les lipoprotéines selon leur taille, 300 µL de plasma sont injectés sur une colonne Sepharose 6HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et élués à flux constant (0,2 ml/minute) avec du PBS (pH 7,2). La densité optique de l'effluent est enregistrée à 280 nm. L'effluent est collecté par fraction de 0,3 ml. Les concentrations de lipides dans les différentes fractions sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur.

Les résultats obtenus confirment les effets *in vivo* des composés selon l'invention. En outre, on observe une diminution du cholestérol dans les différentes classes de lipoparticules particulièrement les particules de grande taille (VLDL) et les particules de petite taille (HDL). On observe de plus une distribution typique des triglycérides principalement localisés dans une population de lipoparticules de grande taille. La concentration en triglycérides y est nettement diminuée. Cette diminution est caractéristique des effets des activateurs de PPAR α .

3) Analyse des ARN

L'ARN total est isolé des fragments de foie par extraction à l'aide du mélange thiocyanate de guanidine/phénol acide/chloroforme suivant le protocole décrit précédemment (Raspe, Madsen et al. 1999). Les ARN messagers sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I kit (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cycler System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ACO, Apo CIII, Apo AI, CPT-I et CPT-II sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins.

Les inventeurs montrent ainsi que l'expression des gènes impliqués dans le transport ou le catabolisme des lipides augmente, ce qui confirme les résultats

obtenus précédemment (activation des PPARs et diminution des taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides).

5 **EXEMPLE 20 : Evaluation des propriétés antioxydantes des composés selon l'invention**

A-/Protection de l'oxydation des LDL par le cuivre :

10 L'oxydation des LDL est une modification importante et joue un rôle prépondérant dans la mise en place et le développement de l'athérosclérose (Jurgens, Hoff et al. 1987). Le protocole suivant permet la mise en évidence des propriétés antioxydantes des composés. Sauf mention différente, les réactifs proviennent de chez Sigma (St Quentin, France).

15 Les LDL sont préparés suivant la méthode décrite par Lebeau et al. (Lebeau, Furman et al. 2000).

Les solutions de composés à tester sont préparées à 10^{-2} M dans de l'éthanol et diluées dans du PBS pour avoir des concentrations finales allant de 0,1 à 100 μ M pour une concentration totale d'éthanol de 1% (v/v).

20

Avant l'oxydation, l'EDTA est retiré de la préparation de LDL par dialyse. L'oxydation a ensuite lieu à 30°C en ajoutant 100 μ l d'une solution à 16,6 μ M de CuSO_4 à 800 μ L de LDL (125 μ g de protéines/ml) et 100 μ l d'une solution du composé à tester. La formation de diènes, l'espèce à observer, se mesure par densité optique à 234 nm dans les échantillons traités avec les composés en présence ou en absence de cuivre . La mesure de la densité optique à 234 nm est réalisée toutes les 10 minutes pendant 8 heures à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté (Kontron Uvikon 930). Les analyses sont réalisées en triplicata. Nous considérons que les composés ont une activité

25 antioxydante lorsqu'ils induisent un décalage de phase par rapport à l'échantillon témoin. Les inventeurs mettent en évidence que les composés selon l'invention retardent l'oxydation des LDL (induite par le cuivre), ceci indiquant que les

30

composés selon l'invention possèdent un caractère antioxydant intrinsèque. Un exemple de résultats obtenus avec des composés selon l'invention est présenté dans la figure 4.

- 5 La figure 4 montre que les composés selon l'invention, Ex 2, 4, 5, 6 et 13, possèdent des propriétés antioxydantes intrinsèques et favorisent également le ralentissement de la vitesse d'oxydation des LDL par le cuivre. En effet, ils induisent un décalage de la lag phase, celle-ci est retardée lors du traitement des cellules par les composés selon l'invention de 13,4% pour l'exemple 2
10 jusqu'à 34,3% pour l'exemple 4 (voir figure 4A). Les composés selon l'invention ne semblent pas modifier la vitesse d'oxydation (voir figure 4B) ni la quantité de diènes formés (voir figure 4C).

- 15 B-/Evaluation de la protection conférée par les composés selon l'invention vis-à-vis de la peroxydation lipidique :

La mesure de l'oxydation des LDL est réalisée par la méthode des TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).

- 20 Selon le même principe que celui décrit précédemment, les LDL sont oxydés avec du CuSO_4 et la peroxydation lipidique est déterminée de la manière suivante :

- Les TBARS sont mesurés à l'aide d'une méthode spectrophotométrique, l'hydroperoxydation lipidique est mesurée en utilisant l'oxydation peroxyde-lipide dépendante de l'iodide en iode. Les résultats sont exprimés en nmol de
25 malondialdéhyde (MDA) ou en nmol d'hydroperoxyde/mg de protéines.

- Les résultats obtenus en mesurant l'inhibition de la formation de diènes conjugués, sont confirmés par les expériences de mesure de peroxydation lipidique des LDL. Les composés selon l'invention protègent également de manière efficace les LDL contre la peroxydation lipidique induite par le cuivre
30 (agent oxydant).

Exemple 21 : Mesure des propriétés antioxydantes des composés selon l'invention sur des cultures de cellules

A-/Protocole de culture :

5 Les lignées cellulaires utilisées pour ce type d'expériences sont de type neuronales, neuroblastomes (humains) et cellules PC12 (rat). Les cellules PC12 ont été préparées à partir d'un pheochromocytome de rat et sont caractérisées par Greene et Tischler (Greene and Tischler 1976). Ces cellules sont couramment utilisées pour des études de différenciation neuronale, transduction
10 du signal et mort neuronale. Les cellules PC12 sont cultivées comme précédemment décrit (Farinelli, Park et al. 1996), dans du milieu complet RPMI (Invitrogen) complémenté avec 10% de sérum de cheval et 5% de sérum de veau foetal.

Des cultures (primaires) de cellules endothéliales et muscles lisses sont également utilisées. Les cellules sont commandées chez Promocell (Promocell
15 GmBH, Heidelberg) et sont cultivées selon les indications du fournisseur.

Les cellules sont traitées avec différentes doses de composés de 5 à 100 μ M pendant 24 heures. Les cellules sont alors récupérées et l'augmentation de l'expression des gènes d'intérêt est évaluée par PCR quantitative.

20

B-/Mesure des ARMm :

Les ARNm sont extraits des cellules en culture traitées ou non avec les composés selon l'invention. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene, France) selon les indications
25 du fournisseur. Les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche, France). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD), de la Catalase et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes,
30 sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes β -actine et cyclophiline sont utilisées comme sondes témoin.

L'augmentation de l'expression des ARNm, mesurée par RT-PCR quantitative, des gènes des enzymes antioxydantes est mise en évidence dans les différents types cellulaires utilisés, lorsque les cellules sont traitées avec les composés selon l'invention.

5

C-/Contrôle du stress oxydatif :

Mesure des espèces oxydantes dans les cellules en culture :

Les propriétés antioxydantes des composés sont également évaluées à l'aide d'un indicateur fluorescent dont l'oxydation est suivie par l'apparition d'un signal fluorescent. La diminution d'intensité du signal fluorescent émis est mesurée dans les cellules traitées avec les composés de la manière suivante : les cellules PC12 cultivées comme précédemment décrit. (plaque noire 96 puits fonds transparent, Falcon) sont incubées avec des doses croissantes de H_2O_2 (0,25 mM – 1 mM) dans du milieu sans sérum pendant 2 et 24 heures. Après l'incubation le milieu est enlevé et les cellules sont incubées avec une solution de dichlorodihydrofluorescéine diacetate (DCFDA, Molecular Probes, Eugene, USA) 10 μ M dans du PBS pendant 30 min à 37°C et dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 . Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS. La détection de la fluorescence émise par l'indicateur de l'oxydation est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Tecan Ultra 384) à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et une longueur d'onde d'émission de 535 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport au témoin oxydé.

L'intensité de fluorescence est plus faible dans les cellules incubées avec les composés selon l'invention que dans les cellules non traitées. Ces résultats indiquent que les composés selon l'invention favorisent l'inhibition de la production d'espèces oxydantes dans des cellules soumises à un stress oxydatif. Les propriétés antioxydantes décrites précédemment sont également efficaces pour induire une protection antiradicalaire dans des cellules en culture.

D-/Mesure de la peroxydation lipidique :

Les différentes lignées cellulaires (modèles cellulaires cités précédemment) ainsi que les cellules en culture primaire sont traitées comme précédemment. Le

30

surnageant des cellules est récupéré après le traitement et les cellules sont
 lysées et récupérées pour la détermination de la concentration protéique. La
 détection de la peroxydation lipidique est déterminée de la manière suivante : la
 peroxydation lipidique est mesurée à l'aide d'acide thiobarbiturique (TBA) qui
 5 réagit avec la lipoperoxydation des aldéhydes tel que le malondialdéhyde (MDA).
 Après les traitements, le surnageant des cellules est collecté (900 µl) et 90 µl
 d'hydroxytoluène butylé y sont ajoutés (Morliere, Moysan et al. 1991). 1 ml d'une
 solution de TBA à 0,375% dans 0,25M HCL contenant 15% d'acide
 trichloroacétique est également ajouté aux milieux réactionnels. Le mélange est
 10 chauffé à 80°C pendant 15 min, refroidi sur glace et la phase organique est
 extraite avec du butanol. L'analyse de la phase organique se fait par
 spectrofluorométrie ($\lambda_{exc}=515$ nm et $\lambda_{em}=550$ nm) à l'aide du spectrofluorimètre
 Shimazu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Les TBARS sont
 exprimés en équivalents MDA en utilisant comme standard le tetra-
 15 ethoxypropane. Les résultats sont normalisés par rapport au contenu en
 protéines.

La diminution de la peroxydation lipidique observée dans les cellules traitées
 avec les composés selon l'invention confirme les résultats obtenus
 précédemment.

20 Les composés selon l'invention présentent avantageusement des propriétés
 antioxydantes intrinsèques qui permettent de ralentir et/ou d'inhiber les effets
 d'un stress oxydatif. Les inventeurs montrent également que les composés selon
 l'invention sont capables d'induire l'expression des gènes d'enzymes
 antioxydantes. Ces caractéristiques particulières des composés selon l'invention
 25 permettent aux cellules de lutter plus efficacement contre le stress oxydatif et
 donc d'être protégées vis à vis des dommages induits par les radicaux libres.

EXEMPLE 22 : Evaluation des effets sur l'expression d'enzymes impliquées
dans la β -oxydation mitochondriale et peroxysomale

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

5 Les acides gras constituent une réserve essentielle d'énergie. La β -oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras sont les principales voies de catabolisme des acides gras responsables de la mobilisation de cette énergie. Ces deux processus jouent donc un rôle primordial dans le contrôle des taux sériques d'acide gras libres ainsi que dans la régulation de la synthèse des triglycérides. L'enzyme qui détermine la vitesse de la β -oxydation peroxysomale
10 est l'ACO. La β -oxydation mitochondriale est limitée par le transport des acides gras au sein de la mitochondrie. Celui-ci dépend de l'activité des enzymes CPT-I et CPT-II. La régulation de l'expression des enzymes ACO, CPT-I et CPT-II joue un rôle primordial dans le contrôle de β -oxydation peroxysomale et mitochondriale, respectivement.

15

Les composés selon l'invention induisent l'expression de l'ACO, de CPT-I et de CPT-II. Cette activité a été mise en évidence de la manière suivante :

20 Les hépatocytes de rats sont isolés par perfusion de foies de rat Wistar OFA mâles (Charles River, L'Arbresle, France) dont le poids corporel est compris entre 175 et 225 g à l'aide d'un mélange de collagénase et de thermolysin (Blendzyme 3, Roche, Bâle, Suisse). Le foie de rats anesthésiés au pentobarbital est perfusé via la veine porte, d'abord par 100 ml d'un tampon de lavage (Liver perfusion medium, Gibco, Paisley, UK) et ensuite par 200 ml du milieu de
25 digestion suivant : HBSS dépourvu de CaCl_2 et MgSO_4 (Sigma, St Louis, MI, USA) supplémenté de 10 mM Hepes, pH 7,6, de 4 mM CaCl_2 et de 7 mg de Blendzyme 3 suivant une modification du protocole décrit (Raspe, Madsen et al. 1999). Lorsque la viabilité des cellules déterminée par test au Bleu Trypan (Sigma, St Louis, MI, USA) excède 80%, les hépatocytes sont étalés dans des
30 boîtes de culture à 6 puits à raison de 10^5 cellules/cm² pour les expériences de quantification des ARN messagers. Les cellules sontensemencées et incubées pendant 4 heures dans un milieu de culture Williams E supplémenté de 100 U/ml

penicillin (Gibco, Paisley, UK), 2 mM L-Glutamine (Gibco, Paisley, UK), 2 % vol/vol UltroSER SF (Biosepra, Cergy St-Christophe, France), 0,2% masse/vol albumine sérique bovine (Sigma, St Louis, MI, USA), 1 μ M Dexamethasone (Sigma, St Louis, MI, USA) et 100 nM T3 (Sigma, St Louis, MI, USA).

5 L'expérience est ensuite poursuivie dans le même milieu de culture dépourvu d'Ultroser. Les composés testés sont ajoutés à la concentration indiquée directement dans le milieu de culture.

10 L'ARN total est isolé des fragments de foie par extraction à l'aide du mélange thiocyanate de guanidine/phénol acide/chloroforme suivant le protocole décrit précédemment (Raspe, Madsen et al. 1999). Les ARN messagers sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative à l'aide du kit Light
Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I kit (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cycler System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse).

15 Des paires d'amorces spécifiques des gènes ACO, Apo CIII, Apo AI, CPT-I et CPT-II sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

20 L'ARN isolé d'hépatocytes en culture primaire décrits ci-dessus ou de fragments de foie prélevé sur des rats traités avec les composés testés sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative comme décrit dans les exemples 18 et 19 à l'aide de paires d'amorces spécifiques des gènes ACO, CPT-I et CPT-II.

25

EXEMPLE 23 : Evaluation des capacités d'oxydation des acides gras

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

30

Les capacités d'oxydation des acides gras déterminent les taux sériques d'acides gras libres ainsi que la possibilité de synthèse des triglycérides. Une

accumulation d'acide gras libres dans le sang ou de triglycérides en dehors du tissu adipeux favorisent la résistance à l'insuline. D'autre part, une élévation des taux plasmatiques de triglycérides est actuellement considérée comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Une augmentation des capacités d'oxydation des acides gras présente donc un intérêt thérapeutique.

Les composés selon l'invention activent l'oxydation des acides gras par les mitochondries et les peroxysomes. Cette capacité a été mise en évidence de la manière suivante :

10

On teste les activités CPT-I et CPT-II mitochondriales selon le protocole décrit par (Madsen et al, 1999).

On teste l'activité ACO selon le protocole décrit par (Asiedu et al, 1995).

15

On teste la β -oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras selon le protocole décrit par (Hovik et al, 1990).

EXEMPLE 24 : Evaluation des effets sur le transport inverse du cholestérol

20

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

25

La corrélation négative entre le taux d'HDL-cholestérol et les maladies cardiovasculaires est aujourd'hui bien connue. La capacité d'un composé à augmenter le transport inverse du cholestérol (RCT) est considérée comme un mécanisme par lequel les HDL protègent de l'athérosclérose.

Le RCT est un processus qui permet au cholestérol, en excès dans les tissus extra-hépatiques, d'être récupéré et exporté vers le foie où il est converti en acides biliaires avant d'être excrété dans la bile.

30

La présence de cellules spumeuses dérivées de macrophages est une des caractéristiques des premières étapes de la formation de la lésion d'athérosclérose.

L'efflux du cholestérol des macrophages est donc une phase critique pour la prévention de la formation des cellules spumeuses et, par conséquent, présente un effet protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose. L'étape cruciale du RCT est le transfert du cholestérol en excès et des phospholipides des membranes cellulaires aux HDL naissantes. A ce titre, le transporteur ABCA1 (ATP binding cassette A1) joue un rôle clef dans ce processus et son expression est corrélée avec la réduction du développement de la plaque d'athérosclérose en stimulant l'efflux de cholestérol dans les macrophages.

D'autre part, il a récemment été démontré que ABCA1 est un gène cible du récepteur nucléaire LXR α , lui même gène cible des récepteurs PPAR α et PPAR γ .

Les composés selon l'invention induisent l'expression de LXR α et d'ABCA1 et stimulent l'efflux du cholestérol dans 2 modèles *in vitro* de macrophages THP1 et primaires.

1/ mesure de l'expression d'ABCA1 et de LXR α :

a/ Différentiation et traitement des macrophages humains THP-1 et primaires

Des monocytes THP-1 (ATCC, Rockville, Maryland) sont étalés dans des boîtes de culture à 6 puits en présence de PMA (Phorbol myristate acetate) et de sérum de veau foetal et incubées à 37°C pendant 6 jours, ce qui permet leur différenciation en macrophages.

En ce qui concerne les macrophages primaires, les cellules mononuclées sont isolées à partir de sang humain comme précédemment décrit (Chinetti et al. 2001) et sont étalées sur des plaques 6 puits et cultivées pendant 10 jours en présence de sérum humain pour permettre l'adhérence et la différenciation des monocytes primaires en macrophages.

Le traitement à l'aide des différents composés est réalisé pendant 48h dans un milieu sans sérum humain ou de veau foetal mais supplémenté avec du sérum Nutridoma HU (Boehringer) à 1%.

b/ Mesure des ARN messagers

Les ARN totaux sont extraits des macrophages traités à l'aide du kit RNeasy mini (QIAGEN, Hilden, Germany) suivant les instructions du fournisseur, dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cyclers Fast DNA Master Green 1 (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cyclers System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ABCA1 & LXR α sont utilisées comme sondes.

10

2/ Mesure de l'efflux de cholestérol:

a/ Différentiation et traitement des macrophages humains THP-1 et primaires

15 Les macrophages sont différenciés à partir de monocytes THP-1 ou primaires comme dans l'expérience précédente (1/ mesure de l'expression d'ABCA1 et de LXR α)

b/ Chargement des macrophages en cholestérol et mesure de l'efflux

20

Les macrophages sont pré-traités pendant 24 h avec les composés, mais aussi chaque 24h pendant toute la durée de l'expérience. Ils sont chargés en cholestérol lors d'une incubation de 48h en présence de LDL acétylées (50 μ g/ml contenant du cholestérol marqué au Tritium) dans un milieu RPMI 1640
25 supplémenté avec 1% de Nutridoma HU (Boehringer).

Après cette étape, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et incubées pendant 24h dans du milieu RPMI sans Nutridoma avec ou sans apolipoprotéine A-I. A la fin de cette étape, le milieu est récupéré et les lipides intracellulaires sont extraits dans un mélange hexane / isopropanol, et séchés sous azote.

30

L'efflux est quantifié à l'aide d'un lecteur à scintillation Tri-Carb[®] 2100 TR (Packard, Meriden, CT, USA) en divisant le nombre de coups comptés dans le milieu par le nombre de coups total comptés dans le milieu et dans les cellules.

EXEMPLE 25 : Evaluation des effets sur le syndrome métabolique (syndrome X) et le diabète

- 5 Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

10 La résistance à l'insuline est à la base du syndrome métabolique caractérisé par une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie, une dyslipidémie et l'hypertension. La combinaison de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire qui se traduit par un risque accru de maladies cardiovasculaires consécutives à l'athérosclérose est responsable de la majorité de la mortalité et de la morbidité liée au diabète de type II. Les traitements médicamenteux du syndrome métabolique ont donc pour principale cible la résistance à l'insuline.

15

Les composés selon l'invention réduisent les manifestations du syndrome métabolique (Syndrome X) telles que l'élévation des acides gras libres, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et la réponse insulinémique au glucose (test de tolérance au glucose) et le diabète dans deux modèles animaux qui
20 présentent une résistance à l'insuline à l'origine du syndrome métabolique, les souris C57BL/6 maintenues sous régime riche en graisse et le rat Zucker obèse (fa/fa). Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

1) Traitement des animaux

25

Des souris C57BL/6 (Charles River, L'Arbresle, France) mâles âgées de 6 semaines au début de l'expérience ont été aléatoirement rassemblées par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. Les souris ont reçu un régime pauvre en graisse (UAR
30 AO4), un régime enrichi en graisse (huile de coco 29% poids/poids) ou le même régime enrichi complété avec les composés étudiés. Des rats Zucker mâles obèses (fa/fa) ou non obèses (fa /+) âgés de 5 semaines ou de 21 semaines

(Charles River, L'Arbresle, France) rassemblés par groupes de 8 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution des taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides soient uniformes sont maintenus sous régime standard. Les animaux sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. La prise de nourriture et la prise de poids sont enregistrées. Les composés testés sont suspendus dans un véhicule (carboxyméthylcellulose 0,5% (CMC) et Tween 0,1%) et administrés par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 15 jours aux doses indiquées. A l'issue du traitement, certains animaux subissent un test de tolérance au glucose comme décrit ci-dessous. A l'issue de l'expérience les autres animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie après un jeûne de 5 heures. Le sang est collecté sur EDTA. Le plasma est préparé par centrifugation, à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes. Des échantillons de foie sont prélevés et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures.

2) Dosage des acides gras libres et des lipides

Les taux d'acides gras libres sont variables chez les rats diabétiques. La concentration en acides gras libres dans le sérum ou le plasma, est mesurée par réaction enzymatique colorimétrique « NEFA/FFA » WAKO (Labo immuno systems, Neuss, Allemagne) sur du sérum ou du plasma.

Les concentrations plasmatiques des lipides (cholestérol total et triglycérides) sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur.

3) Dosage de la glycémie

La mesure de la glycémie s'effectue par une réaction enzymatique colorimétrique (Sigma Aldrich, St Louis, MO).

4) Dosage de l'insuline

Afin de mettre en évidence une hyperinsulinémie, les taux d'insuline sont dosés en utilisant le kit de dosage radioactif (Mercodia, Uppsala, Suède). L'insulinémie est déterminée sur des sérums ou des plasmas récoltés sur EDTA.

5

5) Test de tolérance au glucose

Les animaux ont été anesthésiés après un jeûne de 8 h par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg). Pour initier le test de tolérance au glucose, une injection de glucose (1 g/kg) est réalisée dans la cavité intrapéritonéale avant de collecter des échantillons de sang au niveau de la veine caudale sur des tubes héparinés 0, 15, 30, 45, et 60 minutes après la charge en glucose. Les échantillons sont conservés sur glace, le plasma isolé et conservé à -20°C avant analyse.

15

EXEMPLE 26 : Evaluation des effets sur l'obésité

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

20

L'obésité est associée à une augmentation de la résistance à l'insuline, au diabète de type II et à une augmentation du risque cardiovasculaire et de cancer. Elle joue donc un rôle central dans plusieurs pathologies typiques des sociétés occidentales et de ce fait représente un défi pharmacologique important.

25

Les composés selon l'invention réduisent la prise de poids dans deux modèles animaux qui présentent une obésité, les souris C57BL/6 maintenues sous régime riche en graisse et le rat Zucker obèse (fa/fa). Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

30

1) Traitement des animaux

Des souris C57BL/6 (Iffa Credo, L'Arbresle, France) mâles âgées de 6 semaines au début de l'expérience ont été aléatoirement rassemblées par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. Les souris ont reçu un régime pauvre en graisse (UAR AO4), un régime enrichi en graisse (huile de coco 29% poids/poids) ou le même régime enrichi complété avec les composés étudiés. Des rats Zucker mâles obèses (fa/fa) âgés de 5 semaines (Iffa Credo, L'Arbresle, France) rassemblés par groupes de 8 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution des taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides soit uniforme, sont maintenus sous régime standard complété avec les composés étudiés pendant 15 jours. Les animaux sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. La prise de nourriture et la prise de poids sont enregistrées. A l'issue de l'expérience les animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie. Le plasma est préparé par centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes. Des échantillons de foie et de tissu adipeux sont prélevés, pesés et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures.

2) Dosage de la leptine

La leptine, un marqueur de développement de l'obésité, est mesurée à l'aide du kit de dosage « Rat Leptin assay » de Linco Research (St Charles, MI, USA).

EXEMPLE 27 : Evaluation des effets sur la croissance cellulaire

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

Les composés selon l'invention diminuent la croissance des cellules tumorales.

Cette activité est constatée en utilisant le protocole décrit par (Hvattum et al. 1993).

EXEMPLE 28 : Evaluation des effets des composés sur la resténose

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

5

La prolifération des cellules musculaires lisses est une des principales composantes de l'athérogenèse, de la resténose et de l'hypertension associées aux maladies cardiovasculaires. L'identification d'inhibiteurs de cette prolifération représente donc un défi pharmacologique intéressant.

10

Les composés selon l'invention diminuent la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires *in vitro* et réduisent la resténose *in vivo* dans le modèle d'angioplastie coronarienne au ballonnet chez le rat. Ces propriétés ont été mises en évidence de la manière suivante :

15

1) Mesure de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses d'artère coronaire ou d'aorte proviennent de Promocell (Heidelberg, Allemagne) et sont cultivées selon les indications du fournisseur dans un milieu de culture sélectionné pour les cellules musculaires lisses en présence de 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules cultivées à 50% de confluence sont rendues quiescentes par omission de sérum pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite traitées pendant 3 à 6 jours en présence de mitogènes (10% sérum, 20 ng/ml bFGF ou 2 U /ml α -thrombine) et des composés selon l'invention. A l'issue de l'expérience, les cellules sont trypsinées et comptées à l'hémocytomètre.

20

25

2) Mesure de la resténose dans le modèle d'angioplastie coronarienne au ballonnet chez le rat.

30

Des rats Sprague-Dawley adultes de 200 à 300 g (Iffa Credo, L'Arbresle, France) sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température

constante de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Après une acclimatation d'une semaine, les rats sont pesés et rassemblés par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. L'artère coronaire interne gauche est blessée à l'aide d'un ballonnet comme décrit précédemment (Ruef et al. 2000). Les composés selon l'invention sont suspendus dans un véhicule (carboxyméthylcellulose 0,5% (CMC) et Tween 0,1%) et administrés par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 4, 10 et 21 jours à différentes doses. Le traitement débute un jour avant l'intervention au ballonnet. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux sont ensuite sacrifiés et les artères coronaires sont fixées et analysées comme décrit précédemment (Ruef et al. 2000).

EXEMPLE 29 : Evaluation des effets des composés sur l'hypertension

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

L'hypertension artérielle est un facteur de risque important de maladies cardiovasculaires et représente un défi pharmacologique important.

Les composés selon l'invention diminuent la pression sanguine *in vivo* quand ils sont administrés à des rats spontanément hypertendus (rat SHR) utilisés comme modèle d'hypertension. Ces propriétés ont été mises en évidence de la manière suivante :

1) Traitement des animaux.

Des rats SHR adultes de 200 à 300 g (Harlan France, Gannat, France) sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Après une acclimatation d'une semaine, les rats sont pesés et rassemblés par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. Les composés selon l'invention

sont suspendus dans un véhicule (carboxyméthylcellulose 0,5% (CMC) et Tween 0,1%) et administrés par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 7 jours à différentes doses. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture.

5

2) Mesure de la pression sanguine.

La pression sanguine est mesurée selon le protocole décrit précédemment (Siragy et Carey 1997).

10

EXEMPLE 30 : Evaluation des propriétés antioxydantes sur des cultures de cellules

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

15

a) Obtention et culture des kératinocytes humains normaux

Les cultures de kératinocytes humains normaux (KHN) sont réalisées à partir de prélèvements de peau. Le prélèvement est dans un premier temps rincé 4 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline – Invitrogen, France). Il est ensuite décontaminé en le trempant dans deux bains successifs d'éthanol à 70% pendant 30 secondes. On découpe alors des bandelettes de 3 mm de largeur en prenant soin d'éliminer un maximum de tissu adipeux et de derme. Les bandelettes sont alors placées pendant 4h à 37°C dans une solution de trypsine à 0,25% (Invitrogen, France).

20

25

Après séparation de l'épiderme du derme, la préparation épidermique est filtrée et centrifugée pendant 5 minutes à 1000 tours/min. Le culot est repris avec du milieu KHN-D (DMEM + 10% sérum de veau fœtal (SVF) + hydrocortisone 0,4 µg/ml + EGF 10 ng/ml + toxine cholérique 10^{-9} M, (Sigma, St Quentin, France)). Les cellules sont comptées puisensemencées à 10×10^6 cellules/75 cm².

30

Après 24h de culture, le milieu est changé, les cellules sont rincées avec du PBS et on utilise pour la suite de la culture du milieu de prolifération K-SFM (Invitrogen, France). Les cellules sont ensuiteensemencées à la densité voulue.

- 5 Le milieu des cellules est changé toutes les 48h et elles sont cultivées à 37°C avec 5% CO₂. Le traitement des cellules avec ou sans les composés selon l'invention est effectué avant la confluence (70-80%), les composés sont ajoutés à des concentrations variant de 1 à 100µM directement dans le milieu de culture.

10 b) Obtention et culture des fibroblastes humains

- Les cultures de fibroblastes humains normaux sont réalisées à partir d'un prélèvement de peau. Le prélèvement est dans un premier temps rincé 4 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline - Invitrogen, France). Il est ensuite
- 15 décontaminé en le trempant dans deux bains successifs d'éthanol à 70% pendant 30 secondes. Des morceaux de derme d'une surface d'environ 5 mm² sont déposés au fond d'une boîte de Pétri. Une fois que les morceaux ont adhéré au support (environ 5 min), ils sont recouverts de 4 ml de DMEM 20 % de SVF. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Les cellules sortent de
- 20 l'explant au bout d'une semaine et colonisent alors la boîte de Pétri. Lorsque les cellules ont colonisé le support, elles sont trypsinées, réensemencées et cultivées dans du milieu de culture DMEM 10% SVF à 37°C et 5% CO₂ (Invitrogen, France). Le traitement des cellules est effectué à la confluence de celles-ci, les composés selon l'invention sont ajoutés à des concentrations
- 25 variant de 1 à 100 µM directement dans le milieu de culture.

c) Mesure des ARN messagers

- Les ARNm sont extraits des kératinocytes et des fibroblastes humains normaux
- 30 en culture traités ou non avec les composés selon l'invention. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene, France) selon les indications du fournisseur. Les ARNm sont

ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche, France). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD) et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes, sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

d) Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la Glutathion peroxydase est déterminée à partir d'extraits protéiques de cellules (kératinocytes, fibroblastes) traitées ou non avec les composés selon l'invention à des concentrations variant de 1 à 100 μ M. La mesure de l'activité de la GPx est également réalisée dans des conditions stressantes pour les cellules, 0,5 mM paraquat ou 0,6 mM H_2O_2 (inducteurs des espèces oxygénées réactives). La mesure de l'activité des extraits protéiques se fait à l'aide du kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma) selon les indications du fournisseur. La mesure indirecte est basée sur l'oxydation du glutathion en glutathion oxydé catalysé par la glutathion peroxydase. Le retour à la forme non oxydée est catalysé par la glutathion réductase et le NADPH (β -nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate). La diminution de l'absorbance du NADPH est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimazu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) et reflète l'activité de la GPx, puisque la GPx est le facteur limitant de cette réaction.

e) Mesure de la peroxydation lipidique

Les réactifs proviennent de chez Sigma (St Quentin, France) sauf lorsque mentionné autrement.

La peroxydation lipidique est mesurée par dosage du malondialdéhyde (MDA) par l'acide thiobarbiturique (TBA). Après les traitements, le surnageant des cellules est collecté (900 µl) et 90 µl d'hydroxytoluène butylé y sont ajoutés (Morliere P. et al. 1991). 1 ml d'une solution de TBA à 0,375% dans 0,25M HCl
 5 contenant 15% d'acide trichloroacétique est également ajouté au surnageant. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 15 min, refroidi sur glace et la phase organique est extraite avec du butanol. L'analyse de la phase organique se fait par spectrofluorométrie ($\lambda_{exc} = 515$ nm et $\lambda_{em} = 550$ nm), en utilisant un spectrofluorimètre Shimadzu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Les
 10 TBARS sont exprimés en équivalents MDA en utilisant comme standard le tétra-éthoxypropane. Les résultats sont normalisés par rapport au contenu en protéines des cellules. L'induction de la peroxydation lipidique est obtenue en traitant les cellules avec du paraquat 0,5 mM (inducteur des espèces oxygénées réactives) ou avec du peroxyde d'hydrogène 0,6 mM pendant 4h. La protection
 15 anti-radicalaire des composés selon l'invention à des concentrations variant de 1 à 100 µM est évaluée par un pré-traitement de 24h, avant l'induction de la peroxydation lipidique.

Le traitement des cellules (kératinocytes et fibroblastes) avec les composés
 20 selon l'invention favorise l'augmentation de l'expression des ARNm des enzymes antioxydantes, SOD et GPx. Cette augmentation d'activité transcriptionnelle se traduit également par une augmentation de l'activité des enzymes concernées. L'incubation des cellules avec les composés selon l'invention réduit la peroxydation lipidique induite par un agent antioxydant.

25

Les propriétés antioxydantes des composés selon l'invention sur des cultures de cellules sont ainsi démontrées.

EXEMPLE 31 : Evaluation des propriétés anti-inflammatoires sur des
 30 **épidermes reconstruits**

Les épidermes reconstruits sont fournis par la société SkinEthic (Nice, France). Les épidermes sont utilisés au 17^{ème} jour (0,63 cm²) lorsque la couche cornée est présente et que l'ultra structure de l'épithélium se rapproche de celle de l'épiderme humain *in vivo*. Les épidermes reconstruits sont maintenus en culture
 5 selon les indications du fournisseur. Les doses de composés selon l'invention employées pour le traitement des épidermes reconstruits varient entre 2 et 10 mg/cm² pendant 24 et 72h.

Les composés selon l'invention qui ont été testés sont les composés dont la
 10 préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

a) Mesure des propriétés anti-inflammatoires

Les épidermes reconstruits sont préincubés avec les composés selon l'invention
 15 à des concentrations variant de 2 à 10 mg/cm² pendant 24h, puis traités pendant 6h avec du SDS 0,4% ou 1µg de TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Le potentiel anti-inflammatoire des composés est évalué à l'aide de la technique ELISA. Les milieux de culture (sous-jacents) des épidermes contrôles ou traités
 20 sont collectés et congelés à -20°C. La quantification de l'interleukine 1-α (IL1-α) est réalisée à l'aide du kit de détection ELISA IL1-α Kit (R&D system, UK) selon les indications du fournisseur.

b) Mesure des ARN messagers

25 Les ARNm sont extraits des épidermes reconstruits traités avec ou sans les composés selon l'invention dans les mêmes conditions que précédemment. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene) selon les indications du fournisseur, les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du
 30 kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche). Des paires d'amorces spécifiques des gènes IL1 (interleukine 1) et IL6, sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces

spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

5 L'application des composés selon l'invention sur les épidermes reconstruits limite de manière significative la sécrétion de la cytokine inflammatoire, interleukine 1, après un stress inflammatoire. Cette diminution de la sécrétion est corrélée à la diminution de l'expression des ARNm de cette cytokine mesurée par RT-PCR quantitative. Ces résultats indiquent que le traitement des épidermes reconstruits avec les composés selon l'invention possèdent des propriétés anti-
10 inflammatoires.

EXEMPLE 32 : Evaluation des propriétés anti-oxydantes sur des épidermes reconstruits

15 Les composés selon l'invention qui ont été testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 16 ci-dessus.

Les épidermes reconstruits sont fournis par la société SkinEthic (Nice, France). Les épidermes sont utilisés au 17^{ème} jour (0,63 cm²) lorsque la couche cornée est
20 présente et que l'ultra structure de l'épithélium se rapproche de celle de l'épiderme humain *in vivo*. Les épidermes reconstruits sont maintenus en culture selon les indications du fournisseur. Les doses de composés selon l'invention employées pour le traitement des épidermes reconstruits varient entre 2 et 10 mg/cm² pendant 24 et 72h.

25

a) Mesure des ARN messagers

Les ARNm sont extraits des kératinocytes (provenant des épidermes reconstruits traités avec ou sans les composés selon l'invention). L'extraction est réalisée à
30 l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene) selon les indications du fournisseur, les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA

Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD) et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes, sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β -actine et GAPDH sont utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

b) Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la Glutathion peroxydase est déterminée à partir d'extraits protéiques d'épidermes reconstruits traités ou non avec les composés selon l'invention (2 à 10 mg/cm²). La mesure de l'activité de la GPx est également réalisée dans des conditions stressantes pour les cellules, 0,5 mM paraquat (inducteur des espèces oxygénées réactives). La mesure de l'activité des extraits protéiques se fait à l'aide du kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma) selon les indications du fournisseur. La mesure indirecte est basée sur l'oxydation du glutathion en glutathion oxydé catalysée par la glutathion peroxydase. Le retour à la forme non oxydée est catalysé par la glutathion réductase et le NADPH (β -nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate). La diminution de l'absorbance du NADPH est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimadzu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) et reflète l'activité de la GPx, puisque la GPx est le facteur limitant de cette réaction.

L'analyse par RT-PCR quantitative montre que l'expression des gènes des enzymes anti-oxydantes (SOD et GPx) est augmentée de manière significative. L'augmentation de la quantité des ARNm de la GPx peut être corrélée à l'augmentation de l'activité de cette enzyme anti-oxydante dans les épidermes reconstruits. Ces résultats soulignent les propriétés anti-oxydantes des composés selon l'invention.

EXEMPLE 33 : Composition cosmétique : crème de jour pour le visage, anti-âge

Glycéryl stéarate + PEG-100 stéarate	6,00 %
Squalane	3,00 %
Polyisobutène hydrogéné	3,00 %
Tricaprylate/caprato de glycérol	3,00 %
Glycérine	2,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	2,00 %
Cire d'abeille	1,50 %
Octanoate de cétostéaryl	1,50 %
Alcool cétylique	1,00 %
Alcool stéarylique	1,00 %
Diméthicone	1,00 %
Gomme Xanthane	0,20 %
Carbomer	0,15 %
1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane	0,10 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

5

EXEMPLE 34 : Composition cosmétique : émulsion-gel pour le visage, anti-rides

Glycérine	5,00 %
Caprylic/capric/Succinic triglycérides	3,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	1,00 %
3-tétradécylthioacétylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane	0,50 %
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50 %
Hydrolysate de protéine de blé	0,50 %
Diméthicone copolyol	0,50 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, E. P., F. P. Doyle, et al. (1960). "Antituberculous sulphur compounds. Part IV. Some dimercaptopropyl esters and related
5 dithiouronium bromides." J Chem Soc: 2674-80.
- Antoniadou-Vyzas, A., G. B. Foscolos, et al. (1986). "Di-adamantane derivatives of α,ω -polymethylenediamines with antimicrobial activity." Eur J Med Chem Chim Ther **21**(1): 73-74.
- Asiedu, D. K., A. al-Shurbaji, et al. (1995). "Hepatic fatty acid metabolism
10 as a determinant of plasma and liver triacylglycerol levels. Studies on tetradecylthioacetic and tetradecylthiopropionic acids." Eur J Biochem **227**(3): 715-22.
- Asset, G., B. Staels, et al. (1999). "Effects of *Pinus pinaster* and *Pinus koraiensis* seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the
15 rat." Lipids **34**(1): 39-44.
- Bhatia, S. K. and J. Hajdu (1987). "Stereospecific synthesis of 2-thiophosphatidylcholines; a new class of biologically active phospholipid analogues." Tetrahedron Lett **28**(33): 3767-3770.
- Chinetti, G., S. Lestavel, et al. (2001). "PPAR-alpha and PPAR-gamma
20 activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." Nat Med **7**(1): 53-8.
- Farinelli, S. E., D. S. Park, et al. (1996). "Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a
25 cGMP-mediated mechanism." J Neurosci **16**(7): 2325-34.
- Gaffney, P. R. J. and C. B. Reese (1997). "Preparation of 2-O-arachidonoyl-1-O-stearoyl-sn-glycerol and other di-O-acyl glycerol derivatives." Tetrahedron Lett **38**(14): 2539-2542.

- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-8.
- 5 Gronowitz, S., B. Herslöf, et al. (1978). "Syntheses and chroptical properties of some derivatives of 1-thioglycerol." Chem Phys Lipids **22**: 307-320.
- Hovik, R., H. Osmundsen, et al. (1990). "Effects of thia-substituted fatty acids on mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation. Studies in vivo and in vitro." Biochem J **270**(1): 167-73.
- 10 Hvattum, E., H. J. Grav, et al. (1993). "Hormonal and substrate regulation of 3-thia fatty acid metabolism in Morris 7800 C1 hepatoma cells." Biochem J **294**(Pt 3): 917-21.
- Jurgens, G., H. F. Hoff, et al. (1987). "Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-- characterization and
- 15 pathophysiological implications." Chem Phys Lipids **45**(2-4): 315-36.
- Kitchin, J., R. C. Bethell, et al. (1994). "Synthesis and structure-activity relationships of a series of penicillin-derived HIV proteinase inhibitors: heterocyclic ring systems containing P1' and P2' substituents." J Med Chem **37**(22): 3707-16.
- 20 Kotsovolou, S., A. Chiou, et al. (2001). "Bis-2-oxo amide triacylglycerol analogues: a novel class of potent human gastric lipase inhibitors." J Org Chem **66**(3): 962-7.
- Lebeau, J., C. Furman, et al. (2000). "Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids." Free Radic Biol Med **29**(9): 900-12.
- 25 Madsen, L., A. Garras, et al. (1999). "Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and carnitine palmitoyltransferase II as potential control sites for ketogenesis during mitochondrion and peroxisome proliferation." Biochem Pharmacol **57**(9): 1011-9.

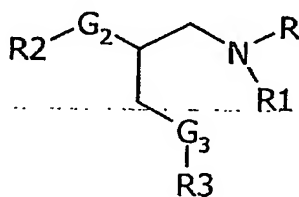
- Marx, M. H., C. Piantadosi, et al. (1988). "Synthesis and evaluation of neoplastic cell growth inhibition of 1-N- alkylamide analogues of glycerol-3-phosphocholine." J Med Chem **31**(4): 858-63.
- 5 Morliere, P., A. Moysan, et al. (1991). "UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1084**(3): 261-8.
- Morris, A. D., G. Atassi, et al. (1997). "The synthesis of novel melphalan derivatives as potential antineoplastic agents." Eur J Med Chem **32**(4): 343-50.
- 10 Murata, M., S. Ikoma, et al. (1991). "New synthesis of 2-thio-PAF and related compounds as substrates of PAF acetylhydrolase and phospholipase A2." Chem Pharm Bull **39**(5): 1335-1336.
- Nazih, A., Y. Cordier, et al. (1999). "Synthesis and stability study of the new pentaammonio lipid pcTG90, a gene transfer agent." Tetrahedron Lett **40**(46): 8089-92.
- 15 Nazih, A., Y. Cordier, et al. (2000). "One-pot transformation of a t-butyl carbamate to a bromoacetamide in the synthesis of the gene transfer agent pcTG201." Synlett **5**: 635-6.
- Rahman, M. D., D. L. Ziering, et al. (1988). "Effects of sulfur-containing analogues of stearic acid on growth and fatty acid biosynthesis in the protozoan *Crithidia fasciculata*." J Med Chem **31**(8): 1656-9.
- 20 Ramalingan, K., N. Raju, et al. (1995). "Synthesis of nitroimidazole substituted 3,3,9,9-tetramethyl-4,8-diaza-undecane-2,10-dione dioximes (propylene amine oximes, PnAOs) : ligands for technetium-99m complexes with potential for imaging hypoxic tissue." Tetrahedron **51**(10): 2875-94.
- 25 Raspe, E., L. Madsen, et al. (1999). "Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR α activation." J Lipid Res **40**(11): 2099-110.

- Ruef, J., S. Q. Liu, et al. (2000). "Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(7): 1745-52.
- 5 Shealy, Y. F., J. L. Frye, et al. (1984). "Synthesis and properties of some 13-cis- and all-trans-retinamides." J Pharm Sci **73**(6): 745-51.
- Siragy, H. M. and R. M. Carey (1997). "The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats." J Clin Invest **100**(2): 264-9.
- 10 Spooner, P. J., S. B. Clark, et al. (1988). "The ionization and distribution behavior of oleic acid in chylomicrons and chylomicron-like emulsion particles and the influence of serum albumin." J Biol Chem **263**(3): 1444-53.
- Urakami, C. and K. Kakeda (1953). "Derivatives of dl-aminopropanediols." Bull Chem Soc Jpn **26**(5): 276-278.
- 15

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une pathologie impliquant une dérégulation du métabolisme des lipides et/ou des glucides, d'une pathologie liée à l'inflammation, et/ou d'une pathologie liée à la prolifération et/ou à la différenciation cellulaire, d'au moins un composé de l'invention répondant à la formule générale (I) :

10



(I)

dans laquelle :

- 15
- G2 et G3 représentent indépendamment un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4, G2 et G3 ne pouvant représenter de façon simultanée un groupe N-R4,
- 20
- R et R4 représentent indépendamment un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
- 25
- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un groupe CO-R5 ou un groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6,

- R5 est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comprenant éventuellement un groupement cyclique, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone,

5

- X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO₂,

- n est un nombre entier compris entre 0 et 11,

10

- R6 est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comprenant éventuellement un groupe cyclique, dont la chaîne principale comporte de 3 à 23 atomes de carbone, de préférence 10 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe SO₂.

15

ses isomères optiques et géométriques, ses racémates, ses sels, ses hydrates et leurs mélanges.

20

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu' un seul des groupes R1, R2 ou R3 représente un atome d'hydrogène.

25

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que, dans le groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, X représente un atome de soufre ou de sélénium et avantageusement un atome de soufre.

30

4. Utilisation selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisée en ce que, dans le groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, n est compris entre 0 et 3, plus spécifiquement compris entre 0 et 2 et est en particulier égal à 0.

5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que R6 comporte un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe SO₂.

5

6. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 est le groupe CO-CH₂-S-C₁₄H₂₉.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'au moins un des groupes R1, R2 et R3 représente un groupe CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6 dans lequel X représente un atome de soufre ou de sélénium et de préférence un atome de soufre et/ou R6 est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 3 à 23 atomes de carbone, préférentiellement 13 à 20 atomes de carbone, de préférence de 14 à 17, plus préférentiellement de 14 à 16, et encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone.

10

15

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'au moins deux des groupes R1, R2 et R3 sont des groupes CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6, identiques ou différents, dans lesquels X représente un atome de soufre ou de sélénium et de préférence un atome de soufre.

20

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que G2 représente un atome d'oxygène ou de soufre, et de préférence un atome d'oxygène.

25

10. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que R2 représente un groupe de formule CO-(CH₂)_{2n+1}-X-R6.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes 1-8, caractérisée en ce que :

30

- G3 est un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et G2 est un atome d'oxygène ; et/ou

- ⊙ R2 représente un groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R6}$.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que R1, R2 et R3, identiques ou différents, de préférence identiques, représentent un groupe $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R6}$, dans lesquels X représente un atome de soufre ou de sélénium et de préférence un atome de soufre et/ou R6 est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 17, encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone, dans lesquels n est de préférence compris entre 0 et 3, et en particulier égal à 0. De manière plus spécifique, d'autres composés préférés sont les composés de formule générale (I) dans laquelle R1, R2 et R3 représentent des groupes $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$.

13. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en que le composé de formule (I) est choisi parmi :

- 3-(tétradécylthioacétylamino)propane-1,2-diol ;
- 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-(dipalmitoyloxy)propane ;
- 3-tétradécylthioacétylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 3-palmitoylamino-1,2-(ditétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-di(tétradécylthioacétylamino)propan-2-ol ;
- 1,3-diamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-dioléoylamino-2-(tétradécylthioacétyloxy)propane ;
- 1,3-ditétradécylthioacétylamino-2-(tétradécylthioacétylthio)propane ; et
- 1-tétradécylthioacétylamino-2,3-di(tétradécylthioacétylthio)propane.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la pathologie liée aux dérèglements du métabolisme lipidique et/ou glucidique est choisie parmi le syndrome X, le diabète, l'athérosclérose et l'obésité.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 13, caractérisée en ce que la pathologie liée à l'inflammation est choisie parmi l'athérosclérose, une allergie, l'asthme, l'eczéma, le psoriasis et les démangeaisons.

5

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 13, caractérisée en ce que la pathologie liée à la prolifération et/ou à la différenciation cellulaire est choisie parmi la carcinogenèse, le psoriasis et l'athérosclérose.

10

17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 13, caractérisée en ce que la pathologie est choisie parmi les maladies cardiovasculaires, le syndrome X, la resténose, le diabète de type I ou II, de préférence de type II, l'obésité, l'hypertension, en particulier l'hypertension artérielle, de cancers, en particulier le cancer de l'anus, du rectum, du colon, de l'intestin, du duodénum, de l'estomac, de la prostate, des testicules, de la vessie, du rein, du pancréas, du foie, du larynx, du sein, des poumons, la leucémie et les mélanomes, et des maladies dermatologiques.

15

18. Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13, dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'une composition cosmétique, pour prévenir ou traiter les effets du vieillissement intrinsèque ou extrinsèque cutané.

20

25

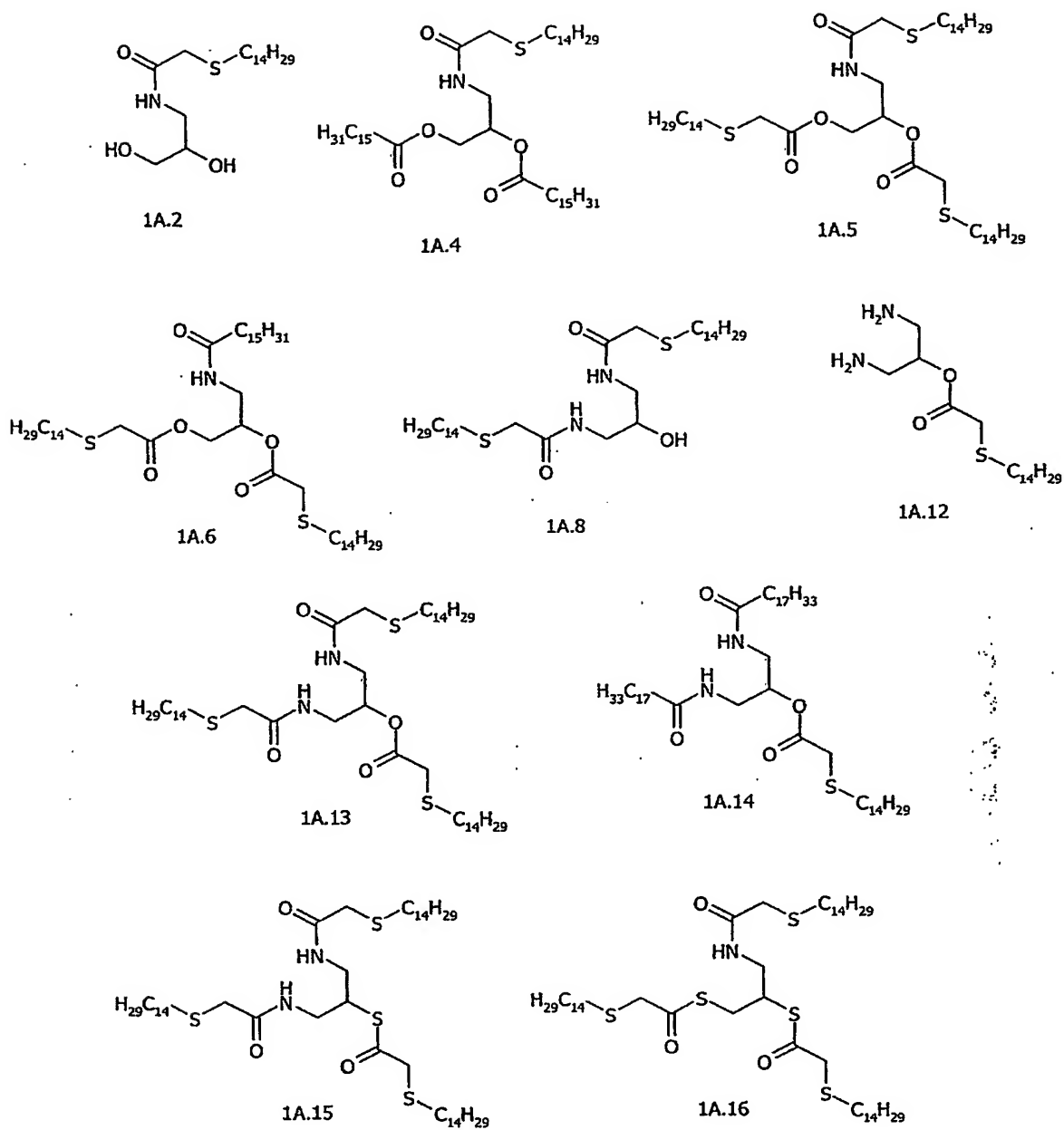


Figure 1

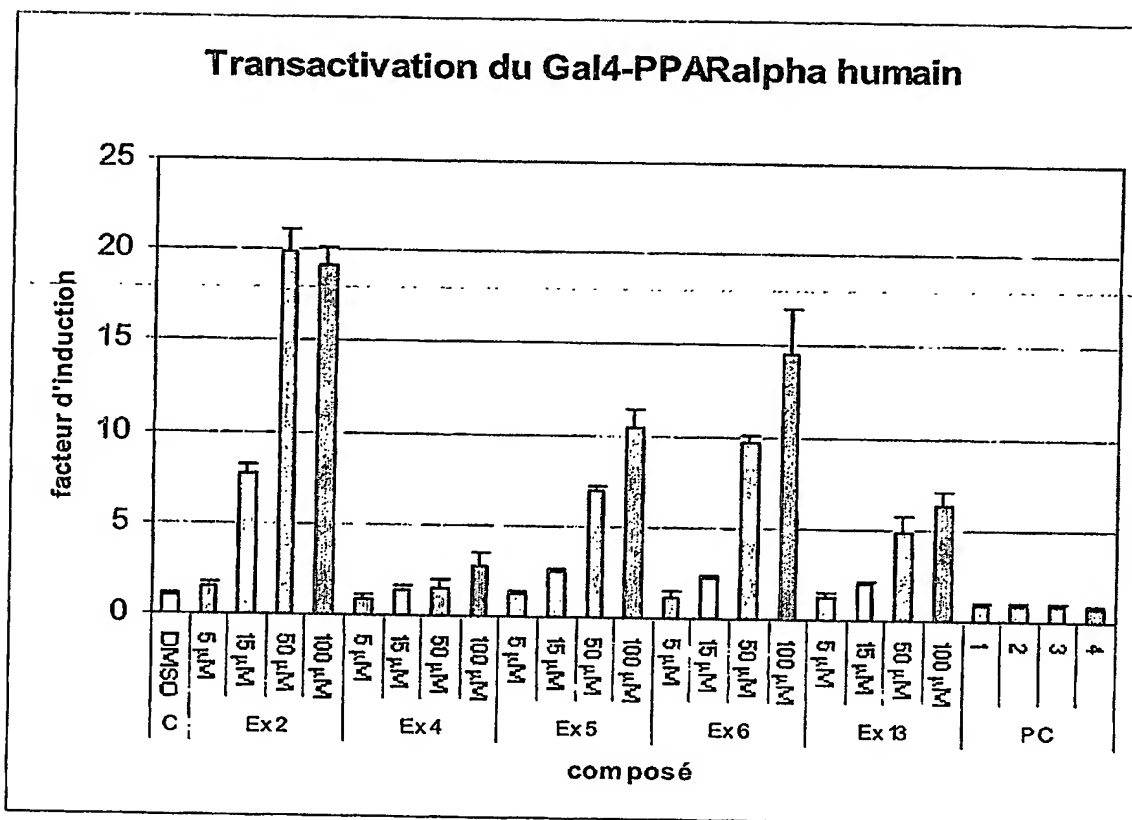
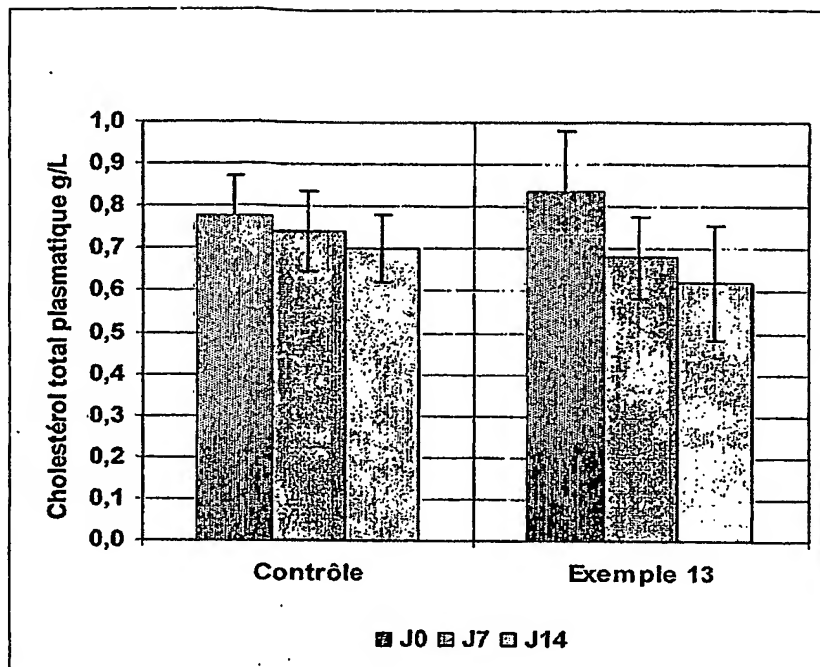


Figure 2

3A



3B

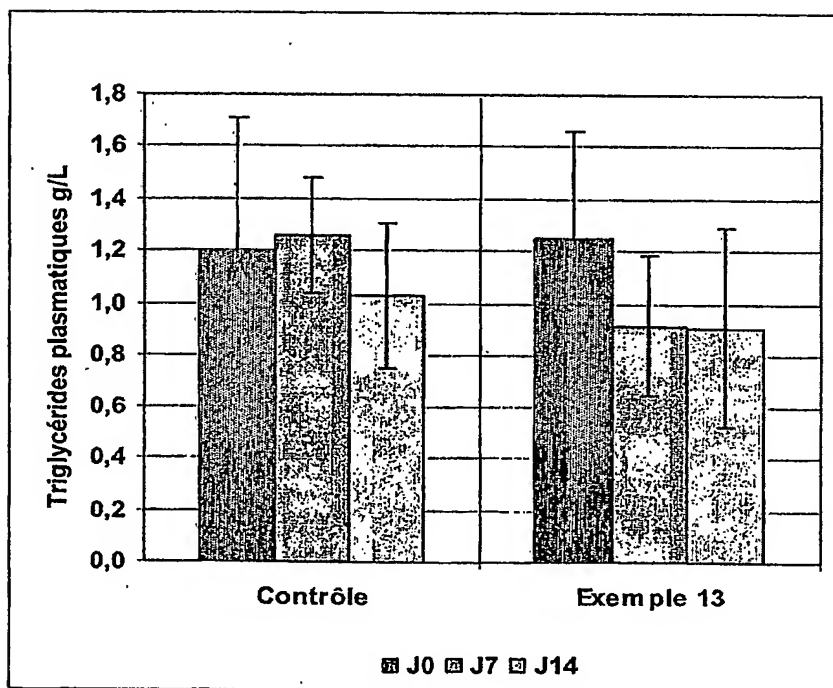
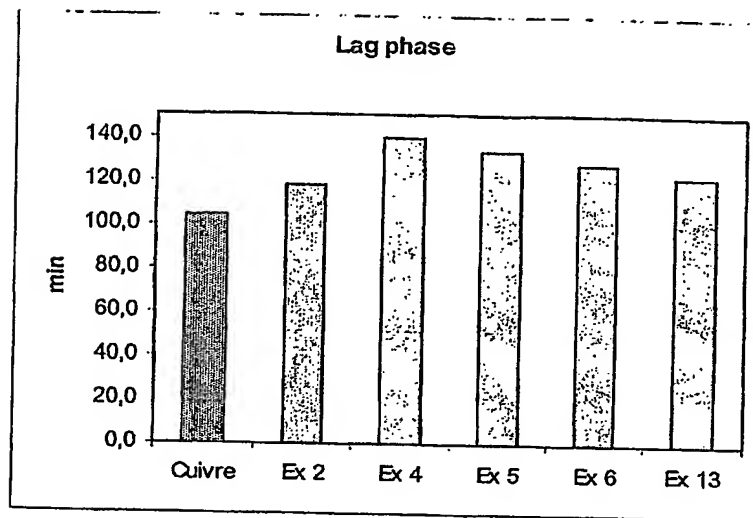
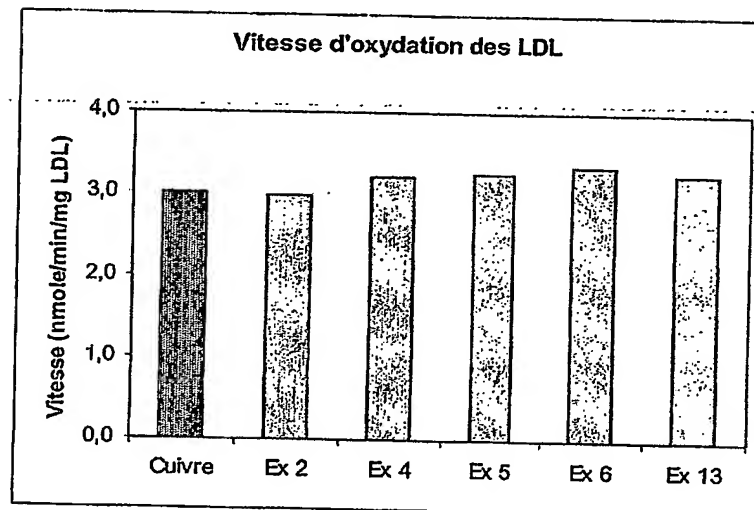


Figure 3

4A



4B



4C

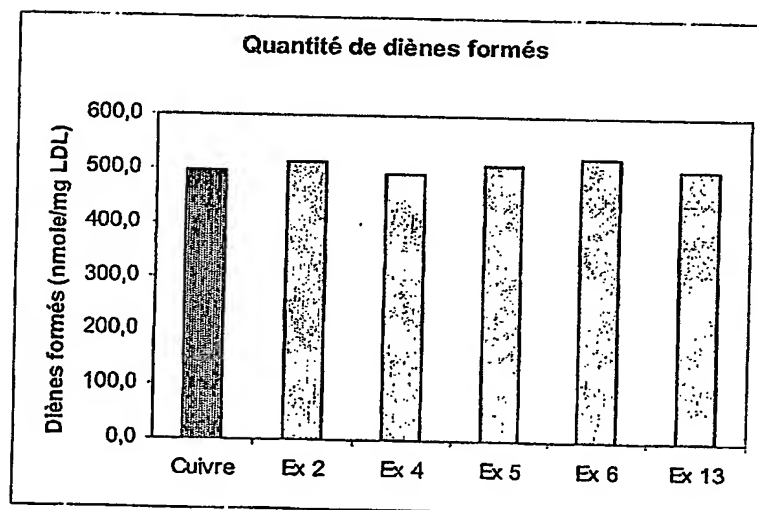


Figure 4



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


N° 11235°03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0187FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 01689
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Utilisations d'aminopropanediols acylés et de leurs analogues azotés et sulfurés		
LE(S) DEMANDEUR(S) : GENFIT		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	NAJIB
	Prénoms	Jamila
Adresse	Rue	185 rue Clémenceau
	Code postal et ville	15 9 2 1 1 Santes
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> 2	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 12 novembre 2003 Béatrice TEZIER HERMAN n°00-10000		